



**La communauté procaryotique dans les zones anoxiques
de deux écosystèmes lacustres : structure et diversité.
Etude plus particulière de son rôle fonctionnel dans le
monimolimnion**

Anne-Catherine Lehours

► **To cite this version:**

Anne-Catherine Lehours. La communauté procaryotique dans les zones anoxiques de deux écosystèmes lacustres : structure et diversité. Etude plus particulière de son rôle fonctionnel dans le monimolimnion. Microbiologie et Parasitologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : 2006CLF21685 . tel-00703327

HAL Id: tel-00703327

<https://theses.hal.science/tel-00703327>

Submitted on 1 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

N° d'ordre

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal
en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Biologie des Populations et des Ecosystèmes)

Par

Anne-Catherine LEHOURS

La communauté procaryotique dans les zones anoxiques de deux
écosystèmes lacustres : structure et diversité.
Etude plus particulière de son rôle fonctionnel dans le
monimolimnion d'un lac méromictique (Lac Pavin).

Composition du Jury :

OLLIVIER Bernard
HUMBERT Jean-François
MAGOT Michel
JEZEQUEL Didier
AMBLARD Christian
FONTY Gérard

Directeur de recherche IRD, Marseille (Rapporteur)
Directeur de recherche INRA, Thonon (Rapporteur)
Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour
Maître de conférence, Université Paris VII
Directeur de recherche CNRS, Clermont-Ferrand
Directeur de recherche CNRS, Clermont-Ferrand

Laboratoire de Biologie des Protistes
UMR CNRS 6023
Université Blaise Pascal, Clermont II

RESUME

Les études présentées dans ce manuscrit traitent de la diversité et de l'écologie des communautés procaryotiques des zones anoxiques pélagiques de deux écosystèmes lacustres : le lac d'Aydat, typiquement eutrophe, qui présente en période de stratification thermique un hypolimnion anoxique ; et le lac Pavin, unique lac méromictique de France, exhibant une zone anoxique permanente.

Les analyses de la structure, de la diversité, et de la dynamique spatiale et- /ou temporelle du bacterioplancton des strates anoxiques de ces deux lacs par des approches moléculaires ont révélé une forte diversité microbienne accentuée par une stratification spatiale du bacterioplancton.

Les investigations complémentaires sur les relations phylogénétiques et sur l'étude de métabolismes microbiens ont été focalisées sur les communautés de la zone anoxique du Lac Pavin en raison de son caractère original. Les banques de clones construites à partir d'échantillons d'eau anoxique prélevés à différentes strates dans le monimolimnion ont révélé que les communautés bactériennes sont dominées par des espèces affiliées aux *δ-Proteobacteria*, aux *Verrucomicrobia*, aux *Bacteroidetes* et à la division candidate OP11. Les séquences ARNr16S des *Archaea* sont principalement affiliées au groupe des *Méthanosarcinales*, observation confirmée par hybridation *in situ*.

Les études *in vitro* de la réduction dissimilatrice du Fe (III), dans des cultures d'enrichissements, ont confirmé que les concentrations élevées en fer ferreux observées dans la sub-chémocline du Lac Pavin résultaient pour partie de l'activité de microorganismes. Dans ces enrichissements, les microorganismes couplent la réduction du Fe (III) avec l'oxydation préférentielle du fumarate, de l'H₂, du CH₄ et du lactate. Aucune accumulation de Fe (II) n'a été notée dans les enrichissements supplémentés en acétate comme donneur d'électrons. Cette observation suggère que ce métabolite pourrait être principalement utilisé dans le processus de méthanogénèse, et pourrait être produit pour partie par l'activité de bactéries Gram-positives homoacétogènes.

L'hétérogénéité des profils TTGE réalisés à partir des différentes conditions d'enrichissements de BFR suggère que ces dernières peuvent occuper des niches écologiques très diverses dans le monimolimnion du Lac Pavin. Aucune séquence n'a été affiliée à des BFR* obligatoires identifiées dans d'autres écosystèmes. L'affiliation de séquences à des espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* suggère que certaines BSR† utilisent cet accepteur d'électron. Des activités significatives de réduction du Fe (III) ont également été mises en évidence chez des souches fermentatives isolées de la zone anoxique de ce lac. L'étude plus particulière de la souche BS2 a révélé que cette voie métabolique pouvait lui conférer un avantage énergétique et donc écologique. L'ensemble du travail qui se situe dans les domaines de l'écologie microbienne et de l'environnement ouvre un large champ d'investigations tant au niveau cognitif qu'appliqué. Les perspectives prévoient d'affiner la compréhension du rôle des microorganismes anaérobies des systèmes lacustres dans les cycles biogéochimiques et plus généralement dans la compréhension du rôle de la biodiversité microbienne afin de répondre de façon raisonnée à une demande sociétale forte dans ces domaines.

Mots clés : Ecologie microbienne, écosystèmes lacustres, anoxie, communautés procaryotiques, biodiversité, méthodes culturales, écologie moléculaire, métabolismes anaérobies.

* BFR : Bactéries ferro-réductrices

† BSR : Bactéries sulfatoréductrices

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements aux rapporteurs ainsi qu'aux membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à Monsieur Amblard pour son accueil au sein du Laboratoire de Biologie des Protistes.

Je remercie vivement Monsieur Fonty, pour son encadrement dès le DEA. La confiance qu'il m'a octroyée et la multitude de discussions que nous avons eu sur des domaines scientifiques extrêmement variés ont probablement été la meilleure formation que j'aurais pu souhaiter. Merci à vous, "Chef", pour m'avoir guidée tout au long de ces années.

Si la recherche nécessite d'acquérir des connaissances fondamentales, les aspects pratiques en sont également indissociables, et, être autonome à la "paillasse" n'est pas inné. Heureusement que tu étais là Corinne, pièce maîtresse des aspects moléculaires dans l'équipe, pour me guider et me former à ces outils tout au cours de mon DEA et de ma thèse. Outre ton indéniable compétence et ta pédagogie, ce fut également un réel plaisir de travailler avec toi. Merci aussi à Aurélie T. pour son aide précieuse.

Pas de manipulations sans échantillons ! Pour cela les deux compères Jean-Claude R et Jean-Claude D, également connu sous les surnoms "118-218" ou "Dupont et Dupont" sont toujours partant. De merveilleux moments sur le Lac Pavin ou le Lac d'Aydat où, entre deux prélèvements nous buvions, sur la barque, un café accompagné de croissants "pur beurre" (intransigeance de JCR sur cet aspect). Bricoleurs hors pair, ces deux Mac-Gyver m'ont aussi débrouillé des situations bien épineuses et le système D s'est souvent révélé concluant. Merci également à Denis, toujours souriant, jamais grognon, même si on doit parfois le faire "tourner en bourrique" avec nos fréquents problèmes informatiques et statistiques. Merci pour ton aide précieuse et ton incroyable patience. Merci aussi à Lionel, récemment arrivé dans l'équipe mais qui se révèle déjà indispensable. J'espère que notre boîte de culture s'ouvrira un jour au fond du Pavin !

Un grand merci à mes collègues des premières années Alex, Aurélie et Yvan avec lesquels j'ai partagé mon bureau, et, malheureusement subi quelques temps leur décoration hors normes. Heureusement, la femme borgne ne sévit plus de nos jours...Après le temps des tentures suspendues fut venu l'époque du bureau bleu. Merci à vous pionniers de cet aquarium (Anne-Hélène, Charlie et Emilie). On a eu de francs moments de rigolade entre les excursions au Nota, les petites bouffes, sans parler de Pipo et Roberto ou de la fameuse bouilloire électrique... Merci en particulier à vous Anne-Hélène et Charlie, dont l'amitié et la joie de vivre ont été des merveilleux "compagnons de route". Je pense aussi à toi mon petit Manu,

dernier du "Clan", à Ischam et N'Dongo, mes deux parasites préférés, mais aussi à toi Olivier de G2IM toujours très Cool. Merci aussi à toi Marie C., Madame anti "bactéries-fossiles".

Merci à Jean Devaux qui m'a, au cours de mon cursus universitaire, transmis la passion de l'Ecologie et m'a convaincue de poursuivre mes études dans ce domaine. Merci à toi, Jean, pour ta persuasion et ton amitié. Je tiens également à exprimer ma gratitude à Didier Debroas pour son co-encadrement au cours de mon DEA, et pour m'avoir ainsi également aidé à franchir cet obstacle me permettant de poursuivre une thèse.

Un énorme merci à tous les membres de l'équipe "Hydrobio".

Petit détour dans l'équipe "Ecotox" : Merci à toi mon grand copain Stéphane, amitié indéfectible depuis nos débuts, pour nos discussions, nos chamaillades, ton réconfort dans les moments de doute. Toujours prêt pour une petite blague (souvent vaseuse !), mais toujours présent quand on a besoin de toi. Mention spéciale également à ma grande Zaza, perle rare, abnégation extrême, adorable et ultra compétente. On s'est connu en travaillant sur le projet FeB, et depuis on ne s'est plus quitté. Mille Mercis à toi, pour ton aide, ton soutien et ton amitié. Merci aussi à toi ma petite Clarisse et à ton transat spécial sieste qui m'a été bien utile ces dernières semaines. Madame ACOMO, la petite maman des étudiants qui veille sur nous comme du Lait sur le feu !! Merci Fred pour tes conseils, pour nos pauses-café autour de l'irremplaçable machine, et d'avoir pris soin de ma forme en me traînant chaque semaine (ou presque) à la piscine.

"Diguedonguedaine Diguedonguedong" : Merci à toi Annie Guedon. Je suis sûre que tu gardes encore des souvenirs émus de tes premiers essais de pilotage au moteur électrique sur la barque, de nos excursions dans le brouillard profond où nous avons même du mal à retrouver la bouée. Merci de m'avoir apporté ton aide précieuse, reine du "Roll-Tube".

Merci à Nathalie, notre secrétaire d'enfer, de n'avoir jamais râlé, et toujours gardé un beau sourire, même si les commandes et les ordres de missions étaient souvent passés à l'extrême limite...

Merci également à tous les membres du Laboratoire de Biologie des Protistes.

Au cours de cette thèse, de nombreuses collaborations pluridisciplinaires ont pu être établies grâce à la volonté de plusieurs personnes que je tiens particulièrement à remercier.

Merci au Laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII dont la passion pour le Lac Pavin est profondément communicative. Toujours disponibles pour des renseignements, pour des discussions, leurs données m'ont été d'une aide précieuses. Je pense en particulier à Didier Jezéquel, Eric Viollier, François Prévot et Nelly Assayag. En espérant que les mystères du Pavin continuent de vous passionner longtemps.

Merci à Gilles Mailhot, qui s'est investi dès les prémices de ce travail. Ces connaissances sur la chimie du Fer nous ont considérablement aidé. Merci également à Marion Rabiet.

Je tiens également à remercier les membres du Laboratoire de Microbiologie de l'INRA de Theix, et sa responsable Evelyne Forano. Merci à mes deux Crotofs (C. Chassard et C. Delhomme), qui m'ont rendu d'énormes services. Que nos excursions hamburgers se poursuivent !!

Merci à Michel Chavarot et Remi Roux pour leur aide précieuse sur les cultures continues.

J'exprime également ma gratitude à M. et Mme Morel du Laboratoire de Thermodynamique de Clermont II, pour leur aide précieuse dans les approches en microcalorimétrie.

Merci à Mme Arbeille et M. Prensier pour les magnifiques photos en microscopie électronique.

Merci à Marius pour son aide en chromatographie ionique

Merci aux membres de l'AgResearch Institute de Palmerston North (NZ), et en particulier à Keith Joblin et Paul Evans pour leur accueil et leur aide.

J'exprime des remerciements sans limites à mes parents. Ils ont toujours soutenu mes orientations, accepté les contraintes que ces choix engendraient et accordé leur complète confiance. À vous mon Papa et ma Maman, deux modèles d'engagement et les plus adorables parents que l'on puisse avoir, MERCI.

À toi François, qui au cours de ces années a partagé mes doutes, mes angoisses mais aussi l'exaltation de ma thèse, qui m'a prêté oreille, qui a imaginé avec moi mille et un protocoles. Merci pour ton soutien, ton aide et ta patience. À ma petite famille que j'adore, à vous Tata, Tonton, Papy, Mamy, que mon indisponibilité a souvent peiné. À Jean-Michel, Sophie, J-François, Sophinette, Matthias, et mes deux merveilleuses petites nièces (Chloé et Emma), mille mercis à vous tous pour votre affection et votre compréhension.

Merci à mes amis (Delphine, Julie, Patrice et Anne, Laurent et Carole, Christian et Sissou, Benoît et Marie, *etc.*) pour leur soutien.

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES



INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE:

- **Figure S. 1 :** Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910) et Sergei Winogradsky (1856-1953).
- **Figure S. 2:** Schéma du concept de la boucle microbienne, d'après Amblard *et al.* 1998.
- **Figure S. 3:** Représentation conceptuelle des interactions entre Science Environnementale et Ecologie Microbienne (d'après Madsen 2005).
- **Figure S.4 :** Structure secondaire de la molécule d'ARNr16S (*E. Coli*).
- **Figure S. 5:** Représentation de l'arbre ARNr universel mettant en évidence les positions relatives des trois domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. La localisation de la racine (Cenancestor) correspond aux propositions des différentes phylogénies (Brown et Doolittle 1995).
- **Figure S. 6 :** Modèle conceptuel pour l'acquisition et l'interprétation des informations en microbiologie environnementale. La colonne 1 fournit une échelle pour évaluer la pertinence de l'information proposée dans les trois autres colonnes. La colonne 2 présente une liste des différentes procédures microbiologiques pouvant permettre d'acquérir des informations sur les microorganismes de l'environnement. Les colonnes 3 et 4 présentent respectivement le type d'informations générées par les différentes procédures méthodologiques et les principales voies d'investigations rétroactives pouvant être utilisées pour valider la pertinence écologique des données microbiologiques.
B : caractérisation biochimique, BG : Biogéochimie, BM : Biomarqueurs, BMo : caractérisation moléculaire (ex : clonage séquençage), G : caractérisation génétique, H : Historique, M : Microscopie, MR : amélioration des conditions de culture, GPMT : génome-protéome-métabolome-transcriptome, P : caractérisation physiologique, SP : sondes pour microscopie (immuno et GPMT), T : caractérisation taxonomique. D'après Madsen 2005.
- **Figure S. 7:** Diagramme schématique illustrant l'utilisation des isotopes pour relier le processus écologique et l'identification du microorganisme impliqué (d'après Radajewski *et al.* 2003). PLFA : Phospholipid fatty acid, IRMS : Isotope ratio mass spectrometry, SIP : Stable isotope probing.
- **Figure S. 8:** Centrifugation en gradient de CsCl/bromure d'éthidium d'ADN marqué. Echantillons individuels et combinés d'ADN extrait de *Methylosinus trichosporium* OB3b sur du méthane marqué en ¹²C et ¹³C comme seule source de carbone, d'après Radajewski *et al.* 2003.
- **Figure S. 9:** Exemples d'images obtenues par la méthode microFISH (d'après Lee *et al.* 1999).
- **Figure S. 10 :** Principales étapes de la technologie microarray. Exemple sur l'expression différentielle de gènes chez deux souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). ORF : open reading fragment, ADNc : ADN complémentaire.
- **Figure S. 11:** Dénaturation, renaturation des brins d'ADN.
- **Figure S. 12 :** Image d'une biopuce.

- **Figure S. 13 :** Regroupement des profils d'expression en clustering hiérarchique.
- **Figure S. 14 :** Schématisation des étapes de construction et d'analyse des bibliothèques métagénomiques à partir d'échantillons naturels d'après Handelsman 2004.
- **Figure S. 15 :** Schéma du protocole expérimental d'encapsulation : les cellules de l'environnement sont encapsulées dans les GMDs et incubées dans des colonnes de croissance (Phase I). Secondairement les GMDs contenant des micro colonies sont détectées et séparées par cytométrie en flux dans 96 puits de microplaque contenant un milieu riche en MO (Phase II). D'après Zengler *et al.* 2002.
- **Figure S. 16 :** Discrimination par cytométrie en flux entre (a) les cellules libres, (b) les GMDs vides ou occupées par une seule cellule, et (c), les GMDs contenant des microcolonies. d à f : microphotographies en contraste de phase des GMDs séparées contenant des microcolonies. D'après Zengler *et al.* 2002.
- **Figure S. 17:** Chambre de diffusion pour la culture *in situ* des microorganismes environnementaux. (A) la chambre est constituée de 2 filtres en polycarbonate (0,03µm de porosité) entre lesquels sont cultivés les bactéries (« en sandwich »). (B) La croissance des bactéries se réalise par incubation des chambres à la surface de sédiment marin. D'après Kaerberlein *et al.* 2002.
- **Figure S. 18:** Positions phylogénétiques de trois nouveaux groupes d'*Archaea* non cultivées, sur la base de l'analyse des séquences 16S rDNA. PJP et pSL représentent des séquences obtenues à partir d'une source hydrothermale du Yellowstone National Park (Schleper *et al.* 1995), d'après DeLong. 1998.
- **Figure S. 19:** Arbre phylogénétique universel, non enraciné indiquant les trois domaines du vivant et la séparation du domaine des *Archaea* en trois groupes (d'après Barns *et al.* 1996).
- **Figure S. 20:** Arbre phylogénétique présentant les quatre grands groupes d'*Archaea* (d'après Allers et Mevarech 2005).
- **Figure S. 21:** Les habitats typiques des bactéries thermophiles : Sources chaudes du Yellowstone national parc (USA), photos Charles Lemarchand 2005.
- **Figure S. 22:** Les coenzymes de méthanogènes. Le MFR, H4MPT, coenzyme M transportent les unités à un carbone au cours de la méthanogénèse (MFR et MPT participent aussi à la synthèse de l'acétyl-CoA). La coenzyme F430 est une coenzyme de la méthyl-CoM méthyltransférase.
- **Figure S. 23:** Conservation des régions génomiques des *Crenarchaeota* marines non cultivées. Cette figure présente une comparaison des régions génomiques de *Crenarchaeota* marines non cultivées issues de différents environnements de 4 régions océaniques. Cette analyse révèle de fortes similarités dans les séquences et l'ordre des gènes. Des gènes orthologues¹ présentant un score >50 (avec blastp) ont été identifiés. D'après Schleper *et al.* 2005.
- **Figure S. 24:** Le domaine des *Archaea* de la diversité à la fonction : L'arbre phylogénétique des Archaea présente les différents groupes d'Archaea non cultivées mis en évidence dans les approches de génomique. Les séquences issues de Fosmides (FOS), Cosmides (COS), chromosome bactérien artificiel (BAC) ou les séquences issues d'assemblages par Shotgun sont présentées dans les cadres autour de l'arbre central. D'après Schleper *et al.* 2005.
- **Figure S. 25 :** Estimation du nombre de nouvelles entrées de séquences ADN 16S dans GenBank de 1993 à 2002. Toutes les séquences entrées avant 1993 sont incluses dans <1993. Ce graphique a été réalisé à partir des données publiées par Rappé et Giovannoni (2003).
- **Figure S. 26 :** Arbre phylogénétique du domaine des *Eubacteria*. Les lignées en noir correspondent aux 12 phyla initiaux, décrits par Woese (1987) sur la base d'espèces cultivées. Les lignées représentées en blanc correspondent aux 14 phylas additionnels. Les lignées en gris

correspondent aux 26 phyla candidats ne possédant pas de représentants cultivés. D'après Rappé et Giovannoni 2003.

■ **Figure S. 27 :** Dendrogramme de 80 séquences ADN_r16s complètes illustrant les relations phylogénétiques entre les membres du phylum des *Verrucomicrobia*. Les sous-groupes 2, 3 et 5 ne contiennent pas de représentants cultivés. D'après Rappé et Giovannoni 2003.

■ **Figure S. 28 :** Dendrogramme de séquences ADN_r16s complètes illustrant les relations phylogénétiques entre les membres du phylum des *Planctomycetes*. D'après Rappé et Giovannoni 2003.

■ **Figure S. 29 :** Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques entre les membres de la division candidate OP11. La source environnementale de chaque séquence est indiquée devant le nom du clone. D'après Hugenholtz *et al.* 1998a.

■ **Figure S. 30:** Exemples de phyla bactériens reconnus et de leur représentation par des isolats cultivés (d'après Hugenholtz *et al.* 1998 a).

■ **Figure S. 31:** Conversion de l'éthanol en acétate et méthane *via* le couplage syntrophique des souches S et M.o.H (d'après Schink et Stams 2003).

■ **Figure S. 32:** Flux de carbone et d'énergie dans la dégradation de la matière organique. Groupes de procaryotes impliqués : 1-Fermentatives primaires, 2- méthanogènes (ou autres hydrogénotrophes), 3- méthanogènes acétoclastes, 4- Fermentatives réductrices de protons (fermentatives secondaires), 5- Bactéries homoacétogènes.

■ **Figure S. 33 :** a- Séquences théoriques des réactions redox dans des écosystèmes sédimentaires marins, b- diagramme des énergies libres.

■ **Figure S. 34:** Conversion homoacétogénique du glucose en acétate. Le glucose est converti en 2 molécules de pyruvate *via* la glycolyse (A) qui libère de l'ATP par la phosphorylation du substrat. Le pyruvate est ensuite oxydé et décarboxylé, conduisant à la formation d'acétyl-CoA, de CO₂, et d'équivalents réduits (B). Les deux acétyl-CoA qui sont produits à partir du pyruvate sont convertis en deux molécules d'acétate, ce processus fournissant de l'ATP par phosphorylation du substrat. Les 8 équivalents réduits produits *via* la glycolyse et la pyruvate-ferredoxine oxydoréductase sont utilisés dans la voie de l'Acétyl-CoA pour réduire deux molécules de CO₂ en une molécule additionnelle d'acétate (C). Le CO₂ est issu de l'environnement et de la décarboxylation du pyruvate. D'après Drake *et al.* (2002).*

■ **Figure S. 35:** Arbre phylogénétique représentant des bactéries acétogènes (en bleue) et leurs espèces affiliées non acétogènes. D'après Drake *et al.* 2006.

■ **Figure S.36:** Les différents niveaux d'oxydation de l'azote.

■ **Figure S. 37 :** Schéma de la structure de la nitrate réductase (d'après Pelmont 1992)

■ **Figure S. 38 :** Arbres phylogénétiques des deux familles de BSR Gram-négatives. D'après Castro *et al.* 2000.

■ **Figure S. 39:** Arbres phylogénétiques des BSR Gram-positives (a), des BSR Gram-négatives thermophiles (b) et des *Archaea* sulfato-réductrices (c). D'après Castro *et al.* (2000).

■ **Figure S. 40:** Formation d'une hydroxyde de fer insoluble : Le métal s'entoure de 6 molécules d'eau. Le départ d'un proton correspond à un pKa de l'ordre de 3, donc rapide à pH neutre et encore plus rapide si le pH s'élève. La base conjuguée formée se lie à un autre complexe formant un dimère, qui perd à son tour un autre proton et ainsi de suite, formant des précipités d'hydroxydes métalliques contenant des milliers d'atomes de fer. Ainsi, les amas d'hydroxyde de fer se forment en emprisonnant des molécules d'eau et leur organisation varie entre une organisation cristalline et un état amorphe.

■ **Figure S. 41:** Arbre phylogénétique des séquences ARNr16S illustrant les principales lignées de bactéries ferro-réductrices (lignes épaisses). D'après Lonergan *et al.* 1996.

■ **Figure S.42 :** Mécanismes proposés pour la réduction dissimilatrice du Fe(III) (A) la réduction de l'oxyde de Fe(III) se réalise *via* un contact direct avec la surface du minéral. (B) La

réduction du Fe(III) est réalisée après solubilisation du Fe(III) par sécrétion de chélateurs. (C) Utilisation de navettes électroniques (substances humiques) (D) Réduction du Fe(III) après excrétion par la cellule bactérienne de navettes électroniques.

■ **Figure S.43:** Utilisation de l'anthraquinone disulfonate (AQDS), analogue des substances humiques, comme accepteur intermédiaire d'électrons pour la réduction de composés inorganiques.

■ **Figure S.44 :** Exemple d'un sidérophore d'*Agrobacterium* (l'agrobactine). La partie gauche montre comment trois noyaux aromatiques de type catéchol s'installent autour du fer dans la ferri-agrobactine. Une molécule organique ne peut former un complexe avec le métal (chélate) que si elle peut adopter une conformation telle que les atomes donneurs soient « présentés » exactement selon la géométrie requise.

■ **Figure S. 45:** Arbre phylogénétique des Méthanogènes (domaine des *Archaea*), d'après Garcia *et al.* 2000.

■ **Figure S. 46 :** Exemple d'écosystèmes hébergeant une méthanogénèse active et de facteurs pouvant conditionner son efficacité.

■ **Figure S. 47 :** Coculture de *Methanobrevibacter* et *Syntrophobacter*. La proximité des 2 groupes métaboliques est indispensable à l'efficacité des échanges. Photos G. Prensier

■ **Figure S. 48:** Découvertes successives sur les processus d'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) et du méthane (OAM).

■ **Figure S. 49:** Processus cataboliques d'oxydation anaérobie du méthane et de l'ammonium.

■ **Figure S. 50 :** Voie biochimique possible pour le processus anammox conduisant à la production de $^{29}\text{N}_2$ à partir d'un substrat (ammonium ou nitrite ^{15}N -marqués). Dans ce modèle, la force proton-motrice est générée par la membrane de l'anammoxosome via la séparation des charges.

■ **Figure S. 51:** Positionnement phylogénétique des *Planctomycetes* impliquées dans le processus anammox. D'après Strous et Jetten 2004.

■ **Figure S. 52 :** Phylogénie des *Archaea* impliquées dans OAM, d'après Strous et Jetten 2004

■ **Figure S. 53 :** (A) Arbre phylogénétique illustrant les relations entre les séquences environnementales de clones ARNr16S d'*Archaea* issus du bassin Santa Barbara et du bassin de l'Eel river, d'après Orphan *et al.* 2001b. (B) Arbre phylogénétique illustrant les relations entre le clone ARNr16S de *delta-Proteobacteria* du Bassin Santa Barbara et Eel River. D'après Orphan *et al.* 2001b.

■ **Figure S. 54:** Voie biochimique possible pour le processus d'oxydation anaérobie du méthane. La méthanogène opérant en inverse cède les électrons à l'accepteur intermédiaire d'électrons, qui est utilisé par la BSR. La première loi de diffusion de Fick postule qu'un gradient de concentration de l'accepteur intermédiaire d'électrons peut exister entre les deux organismes partenaires. Ce gradient limite l'efficacité thermodynamique et cinétique du processus global. CoM : coenzyme M, MP : méthanoptérine, MF : méthanofurane.

■ **Figure S. 55 :** Principales attaques des substituants de noyaux aromatiques catalysées par des microorganismes. (D'après Gibson et Harwood 2002).

■ **Figure S. 56 :** Métabolisme anaérobie du toluène.
(<http://www.biologie.unifreiburg.de/data/bio2/fuchs/ForschungJohannHeider.htm>)

■ **Figure S. 57:** Processus microbiens dans un aquifère contaminé par des hydrocarbures (pétrole). L'oxygène inhibe l'activité des anaérobies mais n'est disponible que dans une mince frange de la zone contaminée. En conditions anoxiques, les anaérobies utilisent des accepteurs d'électrons comme les nitrates, le Fe(III), ou les sulfates pour oxyder le benzène ou d'autres contaminants. Lorsque ces accepteurs d'électrons sont épuisés, le processus de méthanogénèse

intervient permettant de convertir la MO en méthane et CO₂. La production de méthane est ainsi localisée à proximité de la source de contamination. D'après Lovley 2001.

■ **Figure S. 58** : Les communautés microbiennes présentent différentes réponses en regard des contaminations.

■ **Tableau S. 1** : Compilation des signatures lipidiques des bactéries et leurs distributions.

Nomenclature : '!', nombre d'insaturations, 'ω', distance entre la première insaturation et le groupement methyl terminal, 'c' ou 't', isomères géométriques cis ou trans des insaturations, 'i' ou 'a', ramifications iso ou anteiso, 'cy', groupement cyclopropyl, 'me', position du groupement methyl. D'après Spring *et al.* 2000.

■ **Tableau S. 2** : Eléments constitutifs des acides nucléiques et quelques propriétés importantes pour les méthodes SIP. D'après Radajewski *et al.* 2003

■ **Tableau S. 3** : Exemple de processus bioénergétiques récemment mis en évidence (d'après Leadbetter 2003)

■ **Tableau S. 4** : Principaux groupes de microorganismes pélagiques. Les catégories de taille sont définies sur la base du biovolume d'après Sieburth *et al.* 1978.

■ **Tableau S. 5** : Estimation de l'abondance et de la biomasse des procaryotes dans le monde (d'après Rosselló-Mora et Amann 2001).

■ **Tableau S. 6** : Synthèse de la diversité des *Archaea* non cultivables en fonction de l'habitat. (+=Présent; -=absent), D'après DeLong 1998.

■ **Tableau S. 7** : Caractéristiques des groupes principaux d'*Archaea* cultivées (discriminées sur la base de critères morphologiques et physiologiques).

■ **Tableau S. 8** : Tableau synthétique de la distribution des différents phyla dans l'environnement. Etabli à partir des données de Hugenholtz *et al.* 1998a.

□ : >75% des séquences ADN_r 16S de l'habitat

* : entre 25% et 75% des séquences ADN_r16S de l'habitat

Pas de symbole : <25%

Les *Proteobacteria* sont représentées au niveau de la subdivision en raison de la large distribution de ce phylum

■ **Tableau S. 9** : Constantes d'équilibre des processus prédominants dans les écosystèmes aquatiques anaérobies. Ces constantes sont définies à 25°C, d'après Stumm et Morgan 1981. $p_e = \text{activité des électrons} = E_H \cdot F / (2.3RT)$, E_H : potentiel redox (volts), F : Constante de Faraday (96,490 C.mol⁻¹), R : Constante des gaz, T : température (K)

■ **Tableau S. 10** : Les enzymes de la dénitrification, D'après Bothe *et al.* 2000

■ **Tableau S.11** : Organismes fermenteurs capables de réduire le Fe(III) mais non connu pour conserver de l'énergie de cette réduction dissimilatrice.

■ **Tableau S.12** : Bactéries sulfato-réductrices et *Archaea* capables de réduire le Fe(III) mais non connu pour conserver de l'énergie de cette réduction dissimilatrice.

■ **Tableau S. 13** : Contribution du méthane au processus de réchauffement climatique en comparaison d'autres composés (D'après Dautray 1991).

■ **Tableau S. 14** : Principales réactions et valeurs d'énergie libre standards pour la méthanogénèse
D'après Whitman *et al.* 1992.

P RESENTATION DES SITES D'ETUDES:

■ **Figure P.1** : La chaîne des puys

■ **Figure P.2** : L'ensemble Pavin-Montchal

■ **Figure P.3** : Formation d'un cratère de maar

■ **Figure P.4**: (a) Profil de température et de pH mesurée au point central du Lac Pavin en mai 2002 (Données de N. Assayag, 2003) indiquant les zones définies par la stratification thermique (épilimnion, thermocline, hypolimnion). (b) Profil d'oxygène dissous et de conductivité (normalisé à 20°C) définissant une stratification chimique (mixolimnion, chémocline, monimolimnion).

■ **Figure P.5**. Evolution spatio-temporelle des concentrations en O₂ dissous (mg.l⁻¹) et de la température (°C). Données du laboratoire de Géochimie des Eaux, Paris VII.

■ **Figure P.6**: Concentrations d'éléments dissous majoritaires (en μM).

A- Concentrations en formes réactives d'ammonium et phosphate

B- Concentrations en calcium, potassium, chlore, sodium (en μM)

C- Concentrations en sulfates et hydrogène sulfuré (en μM).

Données du Laboratoire de Géochimie des Eaux (Paris VII), Michard *et al.* Données non publiées. Les barres horizontales délimitent la chémocline.

■ **Figure P.7**: Evolution des concentrations en Fer et Manganèse dissous (A) et dans la phase particulaire (B) (la limite entre particulaire et dissous est conventionnellement 0,45μm). Données du Laboratoire de Géochimie des Eaux Paris VII).

■ **Figure P.8**: Indépendance spatiale des cycles du fer et du manganèse. D'après le laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII.

■ **Figure P.9**: Proposition de cycle pour le fer dans la colonne d'eau du Lac Pavin impliquant des processus d'oxydoréduction chimiques et biologiques. L'implication potentielle de microorganismes dans les processus d'oxydation et de réduction du Fe restant à déterminer.

■ **Figure P.10**: Framboïde de pyrite observée dans les sédiments du Lac Pavin. Photo Laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII.

■ **Figure P.11**: Profils des concentrations en Carbone Organique Dissous (COD), Carbone Inorganique Total Dissous (CITD). COD=COTD-CITD, (COTD= Carbone organique total dissous).

Les concentrations sont exprimées en μM pour le COD, en mM pour le CITD.

Les mesures de COD sont issues de la publication de Viollier *et al.* 1995, celles de CITD ont été réalisées par N. Assayag 2003.

■ **Figure P.12:** COD *versus* sodium (élément conservatif) dans le monimolimnion. Ce diagramme permet de voir si les éléments sont impliqués dans des réactions chimiques. D'après Viollier *et al.* (1995).

■ **Figure P.13:** Evolution des concentrations en CO₂ ((H₂CO₃) + (HCO₃⁻) + (CO₃²⁻)), CH₄ et N₂ dans la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin. D'après Michard *et al.* (Données non publiées).

■ **Figure P.14 :** Exemple de processus conditionnant un fractionnement isotopique du carbone. D'après Assayag (2003). Le Carbone inorganique issu de la photosynthèse présente un enrichissement en ¹³C, au contraire le carbone issu de la réoxydation du méthane est fortement appauvri en ¹³C.

■ **Figure P.15 :** Profils δ¹³C (en ‰) en fonction de la profondeur. Données de Nelly Assayag (2003)

■ **Figure P.16 :** δ¹³C vs CIT. D'après N. Assayag 2003.

■ **Figure P.17 :** Profil CH₄=f(Na). Les ruptures de pente révèlent que le méthane ne se comporte pas comme un élément conservatif dans la zone anoxique du Lac Pavin. D'après N. Assayag. 2003.

■ **Figure P.18 :** Principales caractéristiques morphométriques du lac d'Aydat

■ **Figure P.19 :** carte géologique du bassin versant du Lac d'Aydat, extrait de la carte géologique au 1/50000 de Veyre-Monton. D'après Ogier 1999

■ **Figure P.20 :** Profils de température, O₂, pH, TPO₄, Fe²⁺, Mn²⁺ et SO₄²⁻ dans les eaux du Lac d'Aydat en août 1996 lorsque la stratification thermique est bien établie. Les concentrations sont exprimées en mM et les profondeurs en m. Les données ont été acquises par le Laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII et sont issues de la thèse de Ogier 1999.

■ **Figure P.21 :** Température du lac d'Aydat, enregistrée tous les 2m, de 1,3 m à 13,3 m de profondeur, du 28 septembre 1995 au 18 septembre 1996 (Ogier 1999).



■ **Tableau P. 1.** Bilan hydrique du Lac Pavin (en l.s⁻¹), établi par différents auteurs.
Bilan hydrique= (Précipitations +Ruissellement+Infiltration) - (Evapotranspiration potentielle + exutoire).

C

HAPITRE I (HORS PUBLICATIONS):

■ **Figure C.1:** Exemple d'image obtenue en microscopie à épifluorescence après hybridation avec la sonde Arch915 ciblant les *Archaea*.

■ **Figure C.2:** Marquage direct (1) et indirect (2) des sondes marquées utilisant la digoxygénine (DIG), la horseradish peroxidase (HRP) ou le système d'amplification du signal tyramide (TSA). D'après Moter et Göbel 2000.

■ **Figure C.3:** Schéma des principales étapes de l'analyse TRFLP

■ **Figure C.4:** Profils TRFLP de produits PCR amplifiés à partir d'ADN extrait d'échantillons de sols pollués (A, B et C) et non pollué (D). La taille du fragment (en paire de bases) est présentée au sommet de l'électrophorégramme, l'abondance relative de chaque fragment correspond à l'intégration de l'aire des pics (nombre d'unité de fluorescence détectée). Les pics rouges correspondent au standard ADN, les pics bleus et verts représentent respectivement les fragments de restriction obtenus aux extrémités 5' et 3'. (D'après Osborn *et al.* 2000).

■ **Figure C.5 :** Schéma présentant les différentes étapes de l'analyse d'une communauté microbienne par TTGE. L'ADN extrait d'échantillons environnementaux est amplifié par PCR (ARNr16S). Les produits PCR sont séparés par une électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (TTGE). L'affiliation phylogénétique des membres prédominants de la communauté peut être établie après excision et réamplification des bandes d'intérêt. D'autre part la séquence obtenue peut être utilisée pour dessiner des sondes oligonucléotidiques pour la détection de populations bactériennes spécifiques dans l'échantillon environnemental (FISH).

■ **Figure C.6:** Observation du précipité de fer ferrique des échantillons d'eau du monimolimnion du Lac Pavin et conséquences de la formation de ce dernier sur la filtration (en comparaison d'un échantillon du mixolimnion). Les photos ont été réalisées 3 heures après contact avec l'atmosphère.

■ **Figure C.7:** Représentation du nombre de fragments de restriction (TRFs) en fonction de l'enzyme utilisée et du dessalage ou non des échantillons. 15 échantillons du monimolimnion du Lac Pavin sont intégrés dans cette analyse (profondeur 50 m à 90 m). MspI* et RsaI* représente les échantillons digérés respectivement par MspI et RsaI et ayant été dessalés. Par opposition MspI et RsaI représente les échantillons non dessalés. Le signe * au dessus des histogrammes indiquent une évolution statistiquement significative (ANOVA, $p \leq 0,05$).

■ **Figure C.8 :** Analyse factorielle des correspondances présentant les similarités entre les compositions qualitatives (présence/absence) des fragments de restriction (TRFs) obtenus sur les études réalisées sur le Lac Pavin et sur le Lac d'Aydat. (Réalisée avec la logiciel R du package ADE4 (<http://cran.r-project.org/>))

■ **Figure C.9 :** Dendrogramme illustrant la similarité entre les différentes profondeurs d'échantillonnage dans le Lac Pavin. Le dendrogramme a été réalisé en utilisant la distance euclidienne et le coefficient d'agrégation de Ward sur le logiciel SYSTAT 10.

■ **Figure C.10:** Dendrogramme illustrant la similarité entre les différentes dates et profondeurs d'échantillonnage dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat (en noir les dates correspondant à la profondeur 10m, en vert celles correspondant à 12 m et en rouge celles correspondant à 14m). Le dendrogramme a été réalisé en utilisant la distance euclidienne et le coefficient d'agrégation de Ward sur le logiciel SYSTAT 10.

■ **Figure C.11** : Schéma d'un scénario anaérobie basé sur la réduction du fer couplé à l'oxydation du méthane.

■ **Tableau C.1** : Sondes oligonucléotidiques utilisées pour l'hybridation in situ ^aPosition sur l'ARNr 16S, ^b Concentrations en formamide dans le tampon d'hybridation, ^c Concentration en NaCl dans le tampon de lavage (mM), ^d Température d'hybridation (°C).

■ **Tableau C.2** : Exemple de données numériques obtenues. (a) B indique pic bleu (dans l'exemple de la figure 1, correspond aux pics obtenus à l'extrémité 5'), (b) Temps de migration du fragment en minutes durant l'électrophorèse avant qu'il atteigne le détecteur, (c) taille du fragment en paire de bases, (d) hauteur du pic en unité de fluorescence, (e) aire relative du pic en fonction de sa hauteur rapportée à l'aire totale des pics, (f) chaque pic est assigné à un point référence.

■ **Tableau C.3** : Séquences des amorces utilisées dans cette étude.

■ **Tableau C.4** : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification PCR en fonction du domaine procaryotique ciblé (Eubactéries ou *Archaea*) et de l'approche utilisée (TTGE ou TRFLP). Les amorces forward utilisées pour la TRFLP sont marquées en 5' par le fluorochrome FAM, celles pour la TTGE présentent une le GC-clamp.

■ **Tableau C.5** : Cycles PCR en fonction des organismes cibles (*Eubacteria* ou *Archaea*) et de la méthode (T-RFLP ou TTGE). Les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 30 fois.

■ **Tableau C.6** : Sites de coupure des enzymes de restriction utilisées.

■ **Tableau C. 7** : Composition du gel de polyacrylamide.

C **HAPITRE II (HORS PUBLICATION):**

■ **Figure C. 12**. L'Evolution selon Lamarck

■ **Figure C. 13** : L'Evolution selon Darwin

■ **Figure C.14**: Exemple de représentation d'arbre phylogénétique

■ **Tableau C.8**. Récapitulatif des différentes méthodes de reconstruction phylogénétique.

C

CHAPITRE III (HORS PUBLICATION):

■ **Figure C.15:** Après ébullition (10 minutes), les milieux de culture sont refroidis (jusqu'à 60°C) sous atmosphère CO₂ ou N₂.

■ **Figure C.16:** Après ajouts du réducteur et éventuellement de la solution tampon de bicarbonate de sodium, les milieux de culture sont répartis en tubes de Hungate ou de Balch sous atmosphère CO₂ ou N₂.

■ **Figure C.17 :** Ensemencement sur milieu gélosé

■ **Figure C.18 :** Isolement de colonies

■ **Figure C.19:** Photographies des enrichissements sous H₂ avec OHF comme forme de Fe(III) (DF36, Article IV). (A) Coloration de Gram. (B) coloration DAPI (les zones sombres correspondent aux particules OHF) sur lesquelles une agglomération de microorganismes est notée.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	7
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I^{ERE} PARTIE : LES "CHALLENGES" DE L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE.	
I- DE LA MICROBIOLOGIE A L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE.	10
II- CARACTERISER LA DIVERSITE MICROBIENNE : LE "CHALLENGE" DES ANNEES 1990 ?	16
II.A. Emergence de l'outil moléculaire dans les études environnementales : l'ARNr16S révolutionne la vision de la diversité procaryotique.	16
<u>II.A.1.Le concept d'espèce bactérienne et d'espèce moléculaire.</u>	16
<u>II.A.2.L'arbre évolutif procaryote.</u>	20
II.B. La signification de la biodiversité.	21
III- CARACTERISER LA DIVERSITE FONCTIONNELLE : LE "CHALLENGE" DES ANNEES 2000?	24
III.A. L'utilisation des isotopes stables ou techniques SIP (<i>Stable Isotope Probing</i>).	26
<u>III.A.1.Les biomarqueurs lipidiques et les isotopes stables.</u>	28
<u>III.A.2.Les acides nucléiques et les isotopes stables.</u>	30
III.B. Combinaison des méthodes de micro-autoradiographie et d'Hybridation <i>in situ</i> (FISH): MicroFISH.	32
III.C. Transcription reverse (RT-PCR) de l'ARN messager.	32
III.D. Les biopuces ADN ou Microarrays.	34
III.E. Métagénomique, ou Génomique environnementale, ou Génomique des populations.	34
III.F. Cultiver l'"incultivable" : les nouvelles approches.	36
<u>III.F.1.Isolement de nouveaux "physio-types".</u>	37
<u>III.F.2.Cultiver des représentants de nouveaux taxa.</u>	38

II^{EME} PARTIE: LES PROCARYOTES DANS L'ENVIRONNEMENT

I-	LES <i>ARCHAEA</i>	44
I.A.	Historique du "Troisième monde" : de Woese aux années 2000.	44
	<u>I.A.1. Formes ancestrales ou évolution secondaire ?</u>	44
	<u>I.A.2. Evolution des connaissances de la diversité taxonomique des <i>Archaea</i>.</u>	45
	<u>I.A.3. Notre connaissance actuelle de la diversité taxonomique des <i>Archaea</i>.</u>	50
I.B.	Diversité métabolique des <i>Archaea</i> .	52
	<u>I.B.1. Métabolismes identifiés à partir de souches cultivées.</u>	52
	<u>I.B.2. Utilisation de la métagénomique pour prédire des métabolismes spécifiques d'<i>Archaea</i> non cultivées.</u>	55
I.C.	Conclusions.	59
II-	<u>LES <i>EUBACTERIA</i></u>	60
II.A.	Les premiers pas de l'affiliation phylogénétique des <i>Eubacteria</i> .	62
II.B.	L'arbre évolutif des Eubactéries depuis 1987.	64
	<u>II.B.1. Phyla additionnels présentant des membres cultivés.</u>	64
	<u>II.B.2. Emergence des "Divisions Candidates".</u>	68
II.C.	Distribution des phyla d'Eubactéries dans l'environnement.	72
III-	<u>REMARQUES ET CONSIDERATIONS GENERALES.</u>	75

III^{EME} PARTIE : PLACE DES ANAEROBIES AU SEIN DE LA BIOSPHERE.

I-	<u>LA CHAÎNE TROPHIQUE ANAEROBIE</u>	79
I.A.	Concept de la coopération : la syntrophie.	79
I.B.	Flux de carbone et d'électrons entre les différents types trophiques.	79
I.C.	Compétitions entre communautés hydrogénotrophes.	83
	<u>I.C.1. Aspects énergétiques : Energie libre et séquences de réactions redox.</u>	83
	<u>I.C.2. Autres facteurs influençant les compétitions : facteurs liés à la physiologie des espèces microbiennes.</u>	83

II-	<u>PROCESSUS METABOLIQUES ANAEROBIES CLASSIQUEMENT DEFINIS.</u>	87
II.A.	L'acétogénèse	87
II.A. 1.	Définition des acétogènes et de l'acétogénèse	89
II.A.2.	Taxonomie et phylogénie des acétogènes	89
II.A.3 :	Impact global, écologie et perspectives évolutives	91
II.B.	Les bactéries dénitrifiantes et la dénitrification.	93
II.C.	Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et la sulfato-réduction.	95
II.C.1.	Phylogénie des bactéries sulfato-réductrices.	97
II.C.2.	Ecologie des bactéries sulfato-réductrices.	99
II.D.	Les bactéries réduisant le fer (BFR) et la réduction dissimilatrice du fer.	103
II.D.1.	La réduction dissimilatrice du fer : une forme primitive de respiration ?	103
II.D.2.	Les microorganismes réalisant la réduction dissimilatrice du Fe(III) (BFR).	105
II.D.3.	Stratégies pour la réduction dissimilatrice du Fer.	109
II.D.4.	Protéines impliquées dans la réduction dissimilatrice du Fe(III)	112
II.D.5.	Autres capacités métaboliques des BFR	112
II.E.	Les <i>Archaea</i> méthanogènes et la méthanogénèse.	113
II.E.1.	Taxonomie et diversité phylogénétique des <i>Archaea</i> méthanogènes (sur la base d'espèces cultivées).	115
II.E.2.	Ecologie et habitats naturels des méthanogènes.	117
III-	<u>PROCESSUS METABOLIQUES ANAEROBIES RECEMMENT MIS EN EVIDENCE : OAM, ANAMMOX, OXYDATION ANAEROBIE DU FER FERREUX.</u>	119
III.A.	Oxydation anaérobie du méthane et de l'ammonium	121
III.A.1.	Historique.	121
III.A.2.	Diversité des microorganismes impliqués	123
III.A.3.	Conclusions	128
III.B.	Oxydation anaérobie du fer ferreux (FeII).	128
III.B.1.	Oxydation anaérobie du Fe (II) par les bactéries phototrophes.	128
III.B.2.	Oxydation anaérobie du Fe (II) par les bactéries dénitrifiantes.	128
IV-	<u>POTENTIALITES METABOLIQUES DES BACTERIES ANAEROBIES : UTILISATION ET DEGRADATION DE COMPOSES AROMATIQUES.</u>	129
IV.A.	Composés aromatiques comme accepteurs terminaux ou intermédiaires d'électrons.	131

IV.B. Composés aromatiques comme sources d'énergie ou de carbone.	133
IV.C. Remarques	133
IV.D. "Anaerobe to the rescue"	135

PRESENTATION DES SITES D'ETUDES

I^{ERE} PARTIE : LE LAC PAVIN

I. <u>CONTEXTE GEOLOGIQUE.</u>	137
I.A. La chaîne des Puys.	137
I.B. L'ensemble -Pavin-Montchal- les volcans les plus jeunes du Massif Central.	139
II. <u>LE LAC PAVIN : FORMATION GEOLOGIQUE ET DONNEES MORPHOMETRIQUES.</u>	141
III. <u>PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DELIMITANT LES DIFFERENTES STRATES DE LA COLONNE D'EAU.</u>	145
IV. <u>EVOLUTION TEMPORELLE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU MONIMOLIMNION: HYPOTHESE DU "STEADY STATE".</u>	145
V. <u>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU MONIMOLIMNION. DU LAC PAVIN</u>	147
VI. <u>COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DU MONIMOLIMNION ET HYPOTHESES SUR LES CYCLES BIOGEOCHIMIQUES.</u>	149
VI.A. Evolution verticale des éléments inorganiques dissous majoritaires.	149
VI.B. Carbone Organique Total, Carbone Inorganique Total dissous, CO ₂ , CH ₄	153

II^{EME} PARTIE: LE LAC D'AYDAT

I. <u>CONTEXTE GEOLOGIQUE</u>	158
II. <u>CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES EAUX.</u>	160
III. <u>HYDRODYNAMISME DE LA COLONNE D'EAU</u>	160

RESULTATS

CHAPITRE I: STRUCTURE, DIVERSITE ET SUCCESSIONS SPATIO-TEMPORELLES DU BACTERIOPLANKTON DE DEUX BIOTOPES ANAEROBIES

I.	<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	163
II.	<u>MATERIEL ET METHODES</u>	164
II.A.	Prélèvement des échantillons.	164
II.B.	Dénombrement de la flore microbienne	165
	II.B.1. Dénombrement de la flore microbienne totale (coloration au DAPI).	165
	II.B.2. Dénombrement de groupes microbiens ciblés (Méthode FISH : Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization)	165
II.C.	Etude de la diversité des communautés microbiennes par les méthodes de " <i>Fingerprint</i> "	169
III.	<u>RESULTATS</u>	185
✚	<u>Article 1</u> : Anaerobic Microbial Communities in Lake Pavin, a Unique Meromictic Lake in France.	185
✚	<u>Article 2</u> : Successional changes in bacterial community assemblages in response to anoxia in the hypolimnion of a eutrophic lake	212
IV.	<u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u>	236
IV. 1.	Richesse, Diversité, et Structure du bacterioplankton des zones anoxiques des lacs Pavin et Aydat	236
IV. 2.	Successions spatio-temporelles.	239
IV.3.	Premières hypothèses sur les métabolismes putatifs des communautés microbiennes anaérobies du Lac Pavin.	241

CHAPITRE II: DIVERSITE PHYLOGENETIQUE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE LA ZONE ANOXIQUE DU LAC PAVIN

I.	<u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u>	243
II.	<u>PRINCIPES DE LA RECONSTRUCTION PHYLOGENETIQUE</u>	243
II.A.	Principales étapes permettant la création d'un arbre phylogénétique	245
	II.A.1. L'alignement de séquences	245
	II.A.2. Méthodes de reconstruction	247

II.B. Estimation de la robustesse des arbres	249
III. <u>RÉSULTATS</u>	
■ <u>Article 3: Phylogenetic diversity of <i>Archaea</i> and <i>Bacteria</i> in the anoxic zone of a meromictic lake, Lake Pavin (France).</u>	251
IV. <u>DISCUSSION GENERALE</u>	269
IV.A. <u>IMPLICATION S ECOLOGIQUES</u>	270
IV.B. <u>IMPLICATIONS METABOLIQUES ET FONCTIONNELLES</u>	271
<p style="text-align: center;"><u>CHAPITRE III: ETUDES DE METABOLISMES MICROBIENS ANAEROBIES</u> <u>DE LA ZONE ANOXIQUE DU LAC PAVIN : APPROCHES CULTURALES</u></p> <hr/>	
I. <u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u>	274
I.A. Mise en évidence, par méthodes culturelles, de métabolismes microbiens dans le monimolimnion du Lac Pavin -Contraintes et limites des études- .	274
I.A.1. <u>Mise en place de procédures culturelles anaérobies et développement de stratégies culturelles adaptées.</u>	274
I.A.2. <u>Compatibilité entre les durées d'incubations et les études ciblées et finalisées.</u>	275
I.A.3. <u>Psychrophilie et "Barophilie".</u>	275
I.B. Présentation succincte des études réalisées	276
I.B.1. <u>Etude du processus de réduction dissimilatrice du Fe(III)</u>	276
I.B.2. <u>Etude d'un biofilm acétogène</u>	278
II. <u>MATERIEL ET METHODES</u>	278
II.A. Prélèvement des échantillons	280
II.B. Protocole général de préparation et de répartition des milieux de culture en anaérobiose	280
II.C. Protocole général d'ensemencement sur milieu gélosé	280
II.D. Protocole général d'isolement des colonies	281
III. <u>RÉSULTATS</u>	
■ <u>Article 4: Preferential electron donors used for the dissimilatory ferric-iron reducing process by Lake Pavin anaerobic bacteria: A culture-dependent approach.</u>	282

■ Pré-Article 5: Réduction dissimilatrice du Fe (III) par la souche BS2, phylogénétiquement affiliée à <i>Clostridium saccharobutylicum</i> , isolée de la zone anoxique d'un lac méromictique (Le Lac Pavin).	308
---	------------

■ Pré-Article 6: Etude préliminaire d'un biofilm acétogène : Un modèle pour étudier le processus de redondance fonctionnelle ?	333
--	------------

IV. Discussion générale	353
--------------------------------	------------

IV.A. La réduction dissimilatrice du Fe(III)	353
--	------------

IV.A.1. Forme de Fe(III)	354
--------------------------	------------

IV.A.2. Espèces impliquées et métabolismes alternatifs	356
--	------------

IV.A.3. Sources de carbone et d'énergie	357
---	------------

IV.A.4. Conclusions	360
---------------------	------------

IV.B. L'acétogénèse	360
---------------------	------------

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

I- CONCLUSIONS	361
-----------------------	------------

II- PERSPECTIVES	364
-------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	370
------------------------------------	------------

ANNEXES	406
----------------	------------

INTRODUCTION GENERALE



INTRODUCTION GENERALE

“Une bactérie, une amibe..., de quelle destin peuvent-elles rêver sinon de former deux bactéries, deux amibes” Cette fameuse interrogation rhétorique de Francois Jacob (1976) illustre bien le "leitmotiv" des microorganismes : optimiser leur croissance, et, atteindre cet objectif, implique une forte adaptabilité aux conditions et aux fluctuations environnementales. Leurs stratégies adaptatives conditionnent en effet l'efficacité et la nature de leurs processus de régulation. Les conséquences de cette optimisation de la machinerie cellulaire procaryotique sont visibles à l'échelle des écosystèmes, au sein desquels, ces microorganismes sont impliqués dans les cycles biogéochimiques de nombreux éléments.

Comprendre comment les microorganismes établissent d'étroites relations entre eux, agissent en modifiant leur biotope, et s'adaptent perpétuellement aux fluctuations de leur environnement est un défi passionnant mais complexe pour les écologistes microbiens. Le terme de "boite noire" fréquemment utilisé pour qualifier la composante procaryotique traduit bien les difficultés inhérentes à l'étude de cette biocénose. Les vingt dernières années ont été marquées par des avancées conceptuelles et techniques majeures qui ont permis de franchir un certain nombre d'obstacles, et l'ensemble des travaux réalisés laisse apparaître que "rien n'est impossible !". L'extension permanente de la taxonomie des deux domaines procaryotiques, et la mise en évidence de voies métaboliques insoupçonnées repoussent de nombreux dogmes et paradigmes mais soulignent également l'incroyable complexité et l'ampleur des investigations à mener.

L'influence de la composante procaryotique sur leur biotope est probablement exacerbée dans les écosystèmes anoxiques au sein desquels elle règne de façon quasi hégémonique. Dans ces environnements, l'utilisation d'une variété d'accepteurs d'électrons alternatifs à l'O₂ confère aux procaryotes anaérobies un rôle central dans la distribution de nombreux éléments minéraux (Fe, S, Mn, *etc.*) et implique la mise en place, par ces communautés, de processus de spécialisations métaboliques et fonctionnelles et d'interactions syntrophiques ou compétitives. Si les procaryotes anaérobies occupent une place importante dans de nombreux écosystèmes aquatiques, ces derniers font néanmoins l'objet de peu d'études. Les études d'écologie microbienne dans les océans ou dans les lacs se sont essentiellement concentrées sur les strates aérobies, dans lesquelles a été particulièrement analysé le rôle des microorganismes hétérotrophes au sein du réseau trophique aquatique. Dans ces écosystèmes, les zones anoxiques, très souvent réduites aux strates sédimentaires, et dans certains cas aux zones pélagiques profondes (permanente ou temporaire), apparaissent ainsi "découplées" des processus de la boucle microbienne. Néanmoins, les

procaryotes anaérobies, reflet antagoniste mais complémentaire du métabolisme de leurs homologues aérobies, font partie intégrante des flux de carbone et d'énergie. En effet, si le Fe (III) est réduit par les anaérobies, le Fe (II) est disponible pour les ferro-oxydantes, l'H₂S issu de la sulfato-réduction est utilisé par les sulfito-oxydantes, *etc.* Les mécanismes actant dans les environnements anoxiques permettent la régénération des éléments bioactifs nécessaires aux métabolismes procaryotiques aérobies, dérivent une partie du carbone et de l'énergie, et permettent également d'accéder *via* la sédimentation à une minéralisation plus poussée de la matière organique. Ces processus microbiens anaérobies sont donc essentiels au maintien de l'homéostasie des systèmes aquatiques, et ne peuvent ainsi être complètement découplé du fonctionnement global du système.

Dans ce mémoire, seront présentés les travaux réalisés sur les communautés microbiennes des zones anaérobies pélagiques de deux écosystèmes lacustres : le Lac Pavin et le Lac d'Aydat. Les caractéristiques hydrodynamiques de ces deux lacs impliquent que les contraintes de forçage s'exerçant sur les communautés microbiennes anaérobies de leurs colonnes d'eau sont drastiquement opposées. En effet, le Lac Pavin, en raison de son caractère méromictique présente une zone anoxique permanente, au contraire le Lac d'Aydat, périodiquement brassé exhibe une zone anoxique transitoire. Les dynamiques spatiales et /ou temporelles de la structure et de la diversité des communautés anaérobies de chacun de ces lacs ont été décrites dans ce travail. En dépit de l'intérêt que revêt chacun de ces deux modèles, nous avons dans le cadre de cette thèse, plus particulièrement focalisé nos investigations complémentaires sur le rôle des microorganismes dans les zones anoxiques, sur celle du Lac Pavin en raison du caractère particulièrement original de cette dernière. Ce mémoire sera ainsi présenté de la manière suivante :

Une revue bibliographique intégrera différents aspects méthodologiques et conceptuels de l'étude des microorganismes procaryotiques. Le choix de présenter une revue bibliographique relativement "complète" a été motivée par plusieurs objectifs. Ce travail constitue la première étude conduite sur des communautés procaryotiques anaérobies au sein du Laboratoire de Biologie des Protistes, ainsi il apparaissait nécessaire de laisser trace des connaissances bibliographiques acquises au cours de cette thèse. D'autre part, l'approche pluridisciplinaire nécessaire à la conduite de ce travail nécessite que les démarches entreprises soient replacées dans un contexte plus global. Ainsi, trois parties composent cette revue. La première présente les perspectives fournies par les nouvelles approches rétroactives pour la caractérisation métabolique *in situ*, ainsi que les nouvelles procédures d'isolement des microorganismes de l'environnement. Certaines de ces méthodes seront particulièrement détaillées (ex : biomarqueurs et isotopes, biopuces, microFISH, *etc.*) car elles sont actuellement développées ou en voie de développement au Laboratoire de Biologie des

Protistes et constitueront des outils pertinents pour compléter et affiner les études entreprises sur les communautés microbiennes des zones anoxiques des écosystèmes lacustres. La seconde partie de la revue bibliographique retracera l'évolution dans les connaissances de la diversité phylogénétique des *Eubacteria* et des *Archaea*, dont les limites sont, en permanence, repoussées. Enfin sera proposée une revue sur les métabolismes procaryotiques anaérobies "classiquement" définis et ceux de découverte plus récente.

La présentation des principales caractéristiques des deux sites d'études (Lac Pavin et Lac d'Aydat) fera suite à la revue bibliographique, et, dans une seconde partie du mémoire, les résultats de ce travail seront présentés sous forme de trois chapitres, chacun incluant une introduction, une section "matériel et méthode" spécifique et une discussion. Les résultats des études *in situ* seront présentés dans les chapitres I et II, et, le troisième chapitre aura trait à la mise en évidence de métabolismes *in vitro*. Ce dernier chapitre qui intègre des approches pionnières au Laboratoire de Biologie des Protistes, ne peut être complètement abouti dans le cadre de cette thèse. Cependant, afin de conserver une certaine homogénéité dans la structure générale du manuscrit, les résultats seront présentés sous forme de prépublications.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les Organismes Procaryotes
-Ecologie, Diversité, Fonctions-



*"Le commencement de toutes les Sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses
sont ce qu'elles sont. "*

Aristote (384-322 av. J. -C)

I^{ère} PARTIE- LES "CHALLENGES" DE L'ÉCOLOGIE MICROBIENNEI- DE LA MICROBIOLOGIE A L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE.

Un siècle et demi avant Pasteur, Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) consignait des descriptions très précises des premières observations du monde microbien (bactéries, levures, algues, protozoaires). La nature des bactéries s'est imposée peu à peu par l'observation des pathogènes et une période d'une quarantaine d'années, après 1875, a connu un véritable âge d'or de la microbiologie. Elle a donné lieu à un nombre incroyable de découvertes, amorcées par Louis Pasteur (1822-1895) et Robert Koch (1843-1910), largement poursuivies par leurs élèves.

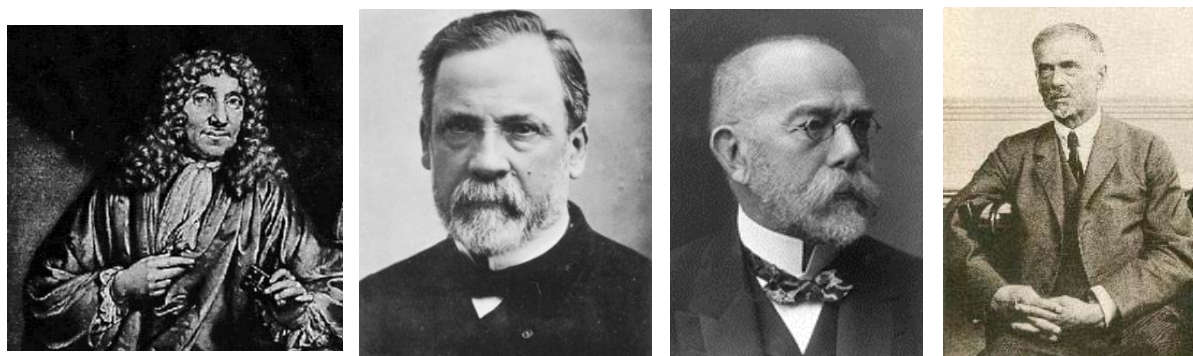


Figure S. 1 : Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910) et Sergei Winogradsky (1856-1953).

L'accent des recherches, mis sur les maladies infectieuses, a cependant contribué à jeter le trouble dans les esprits pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, montrant du doigt les bactéries, les "microbes", comme les ennemis absolus de nos existences et les agents impitoyables de toutes les corruptions et maladies. Heureusement, les observations sur les désordres infectieux ont eu aussi pour effet de stimuler les premières grandes recherches sur l'écologie des microorganismes dans les sols et les milieux aquatiques. Suite aux travaux de Sergei Winogradsky (1856-1953) et de Martinus Beijerinck (1851-1931), un renversement progressif des idées s'est opéré, et les bactéries sont apparues comme les auxiliaires indispensables et bénéfiques de notre environnement.

Si ces deux microbiologistes ont posé, au XIX^{ème} siècle, les fondations des premières études des microorganismes dans l'environnement, il n'est pas aisé de définir précisément les origines de l'écologie microbienne. En outre, deux "types" d'écologie microbienne ont été classiquement définis. Ils diffèrent dans les thèmes de recherche, les questions directrices et les méthodologies. Le premier concerne l'étude de la diversité des mécanismes cellulaires, des processus métaboliques et des interactions entre microorganismes. Cette école relève davantage d'une approche d'autoécologie et trouve ses racines dans la philosophie de Robert Koch (1841-1910). Les "autoécologistes" ont pour objectif premier, l'isolement de souches microbiennes en vue de leur

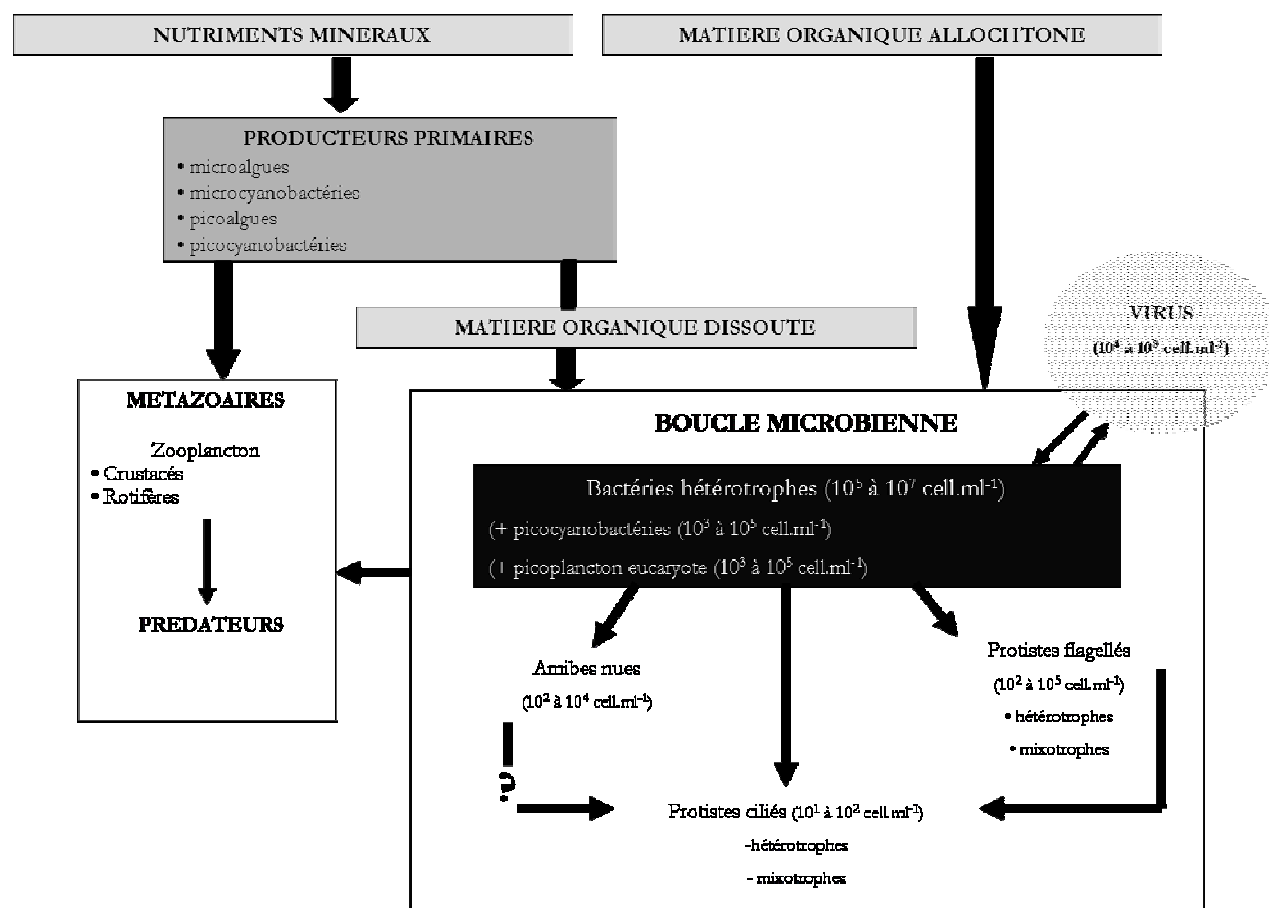


Figure S. 2: Schéma du concept de la boucle microbienne, d'après Amblard *et al.* 1998.

identification et de la caractérisation de leurs capacités métaboliques. Le rôle écologique potentiel des microorganismes dans leur environnement d'origine étant ainsi déduit de leurs caractéristiques physiologiques observées en conditions expérimentales contrôlées. L'autoécologie, qui a dominé les premiers pas de l'écologie microbienne, trouve néanmoins ses limites dans les obstacles inhérents aux méthodes culturelles classiques qui ont conduit à sous-estimer l'importance quantitative et fonctionnelle des procaryotes au sein des écosystèmes. En 1959, **Jannash et Jones** ont montré qu'une estimation de la densité bactérienne par simple observation microscopique révélait des abondances cellulaires différant de plusieurs ordres de magnitude de celles mises en évidence par la méthode du "plate-count" ou sur tests en milieux liquides. Ces observations ont suggéré que la majorité des bactéries dans l'environnement étaient en état de dormance ou même sénescences. Les autoécologistes ont postulé, quant à eux, que ces dernières étaient actives dans leurs milieux naturels mais incapables de croissance dans les conditions de culture définies. Cette hypothèse soulevait des problèmes additionnels : si la majorité des bactéries observables au microscope sont viables mais non cultivables, il apparaît impossible de les identifier par les méthodes traditionnelles de taxonomie. La complexité taxonomique et fonctionnelle des microorganismes, leurs rôles dans les cycles biogéochimiques et au sein des réseaux trophiques n'auraient pu ainsi être révélés par la seule approche d'autoécologie. Dans les années 1960 de nouvelles perspectives initiées par **Parsons et Strickland (1962)** et **Wright et Hobbie (1965)** sont développées. Le terme de synécologie (**Hobbie et Williams 1984**) est proposé pour décrire cette nouvelle approche qui couple la caractérisation physiologique et métabolique d'espèces microbiennes à l'étude des cycles biogéochimiques. Actuellement, le terme d'écologie microbienne regroupe cette double approche. Les études des microorganismes dans les environnements aquatiques nécessitent une connaissance plus large de l'écosystème, des organismes aquatiques et des problèmes généraux de la limnologie ou de l'océanographie que la seule approche microbiologique. Les premiers pas de l'écologie microbienne "moderne", ont néanmoins conduit à considérer la biomasse procaryotique comme une entité unique et à analyser des processus globaux. Cette "boîte noire" était étudiée en terme de flux entrants ou sortants mais la dynamique interne de la boîte restait inexplorée. Les vingt dernières années ont été marquées par des progrès conceptuels et techniques majeurs, et, un certain nombre d'interrogations ont permis d'ouvrir progressivement la "boîte noire" : *Quelle est la composition spécifique et l'abondance des microorganismes hétérotrophes ? Quel est le rôle des microorganismes hétérotrophes au sein des réseaux trophiques ?* Un exemple de concept émergeant fut celui de la boucle microbienne (**Azam et al. 1983, Azam et Ammerman 1984**), qui confère aux procaryotes un rôle plus complexe que celui de la minéralisation de la matière organique et les intègre dans le transfert de cette dernière au sein des réseaux trophiques ([Figure S. 2](#)).

En parallèle au développement de ce concept, des progrès remarquables dans la connaissance de la biodiversité microbienne ont été réalisés. L'émergence des outils de biologie moléculaire dans les études environnementales a mis en relief une impressionnante diversité taxonomique qui suggère une diversité fonctionnelle non moins remarquable. Paradoxalement, les fonctions des microorganismes restent encore largement inexplorées. Considérant que ces derniers sont les premiers agents des processus biogéochimiques, il est probable qu'une des perspectives primordiales des études d'écologie microbienne sera de déterminer les rôles spécifiques des différents microorganismes hétérotrophes au sein de l'écosystème.

La prise de conscience des enjeux posés par la défense de l'environnement a placé et place actuellement les microorganismes sur le devant de la scène, et, à partir des années 1970, une nouvelle aire de la microbiologie a émergé : la microbiologie environnementale. Conceptuellement, cette dernière se situe à l'interface entre deux disciplines majeures, l'écologie microbienne et la science environnementale ([Figure S. 3](#)). Chacune de ces disciplines a récemment fait l'objet d'une extension de ses aires de recherche conduisant à la génération d'une quantité considérable de nouvelles données. Il semble cependant que les informations en attente de découverte dépassent largement nos connaissances actuelles. En effet, les bases des connaissances métaboliques que nous avons sur les microorganismes sont restreintes à un petit nombre d'isolats (<5000) qui représentent moins de 0,1% de la diversité totale estimée à l'échelle de la biosphère. La microbiologie environnementale se distingue de l'écologie microbienne par ses vues appliquées et les enjeux actuels de cette discipline dépassent le cadre de l'étude des pathogènes et de la bioremédiation et incluent la découverte et l'identification de nouveaux microorganismes et de métabolites microbiens pouvant trouver des applications pratiques dans des domaines aussi divers que la protection de l'environnement, la santé humaine et diverses activités commerciales (exemple : enzymes utilisées pour les détergents, l'industrie alimentaire, les biotechnologies...). Un des défis de la microbiologie environnementale est de découvrir des microorganismes viables à partir d'environnements uniques comme les sources hydrothermales marines, les sources chaudes, ou les environnements aquatiques profonds.

Cette nouvelle approche de la microbiologie souligne à nouveau l'importance de la connaissance des traits phénotypiques et physiologiques des microorganismes. Ainsi, l'approche autoécologique, impliquant l'étude d'isolats microbiens, du système qui n'a pu permettre de répondre aux questions essentielles sur l'abondance, la diversité et le rôle global de la fraction procaryotique apparaît être une condition *sine qua non* à la compréhension des processus fonctionnels au sein des écosystèmes et à l'acquisition de nouvelles données métaboliques dans le cadre de perspectives tant fondamentales qu'appliquées.

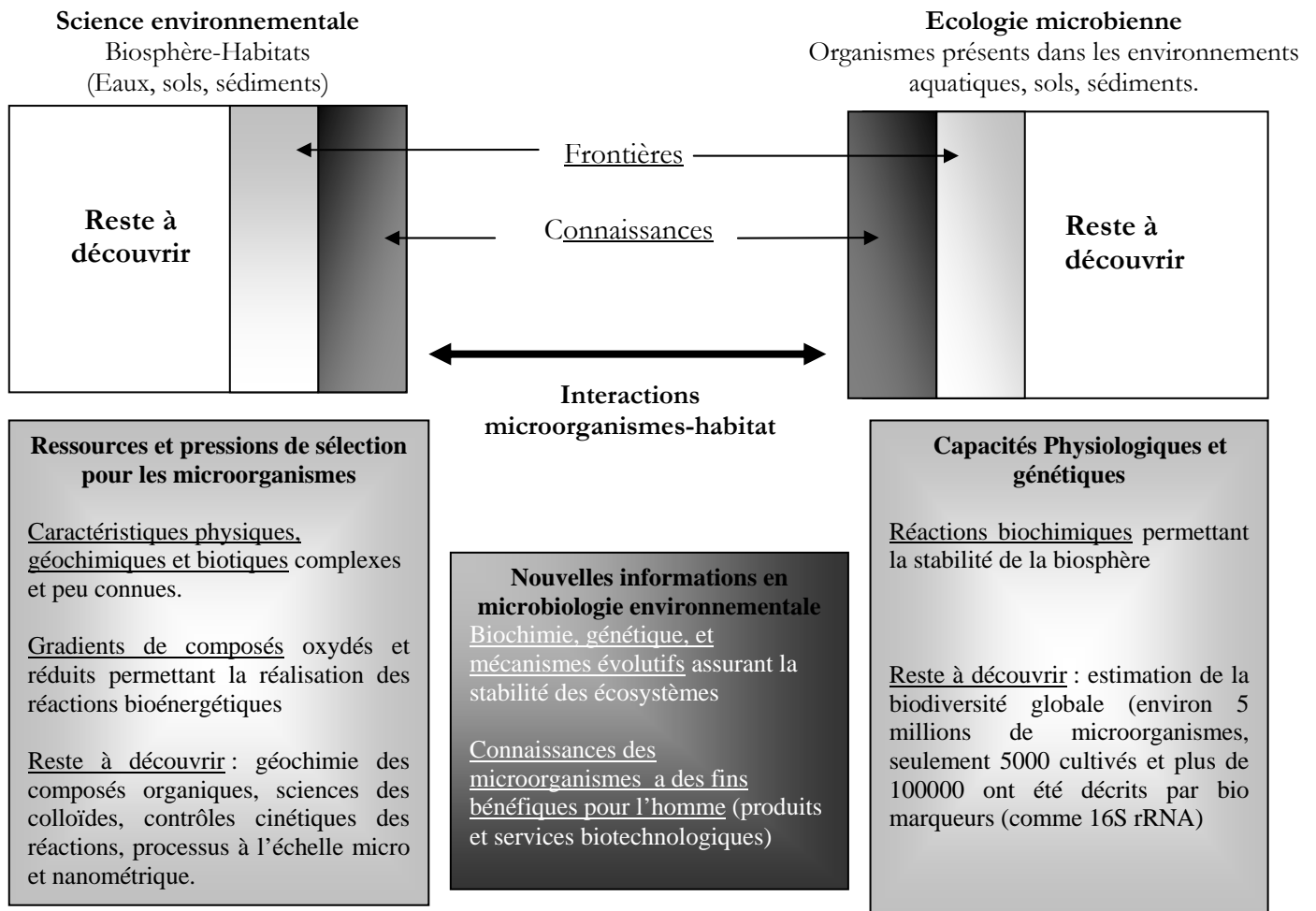


Figure S. 3: Représentation conceptuelle des interactions entre Science Environnementale et Ecologie Microbienne (d'après Madsen 2005).

II- CARACTERISER LA DIVERSITE MICROBIENNE : LE "CHALLENGE" DES ANNEES 1990 ?

La connaissance "quantitative" et "qualitative" de la biodiversité est devenue dans les années 1990 un des axes de recherche majeur en Ecologie mais également un enjeu politique. Le terme de "Biodiversité" a été popularisé par la Conférence sur l'Environnement et le Développement de Rio de Janeiro (juin 1992) qui a conduit à la ratification de la Convention sur la Diversité Biologique par 157 pays membres des Nations Unies. Cette dernière souligne l'importance de la diversité biologique pour le maintien de l'homéostasie des systèmes et de la biosphère, et a entériné ces valeurs au niveau législatif. Le préambule de cette convention souligne les possibilités d'une réduction significative de la diversité résultant des activités humaines, et admet le manque global d'informations et de connaissances sur la diversité biologique ainsi que la nécessité de développer des capacités scientifiques, techniques et institutionnelles afin de poser les bases des études de la biodiversité.

II.A. Emergence de l'outil moléculaire dans les études environnementales : l'ARNr16S révolutionne la vision de la diversité procaryotique.

Alors que l'on estime entre 13 et 14 millions le nombre d'espèces vivant sur la planète (Heywood 1995), moins de 2 millions ont été décrites scientifiquement (May 1988). La très grande majorité des espèces non décrites sont des procaryotes. Cet énorme réservoir de diversité reste inexploré malgré une impressionnante étendue d'habitats colonisés, de processus biochimiques et moléculaires mis en œuvre, une variation génomique et des assortiments symbiontes/commensaux bien plus divers que chez tous les organismes eucaryotes. Bien que l'on ne connaisse encore que très peu de choses, la vision de la diversité microbienne et du rôle des microorganismes dans l'écosystème planétaire sont néanmoins très éloignés des concepts des années 1960-1970. Les années 1990 ont constitué une véritable transition dans le domaine de l'écologie microbienne et l'application des méthodes de biologie moléculaire aux études environnementales a révolutionné la vision du domaine procaryotique.

II.A.1. Le concept d'espèce bactérienne et d'espèce moléculaire.

La microbiologie traditionnelle a établi une taxonomie fondée essentiellement sur des caractères biochimiques et morphologiques : Forme, mobilité, coloration, caractères de fermentations sont couramment utilisés. Cependant, ces différents critères sont souvent rendus imprécis par la variabilité des réponses d'une souche à l'autre ou dans la même souche en fonction du temps et du milieu de culture dont les bactéries sont issues. D'autre part, l'étude des bactéries ne bénéficie pas de la richesse des caractères morphologiques qui distinguent les animaux et les plantes.

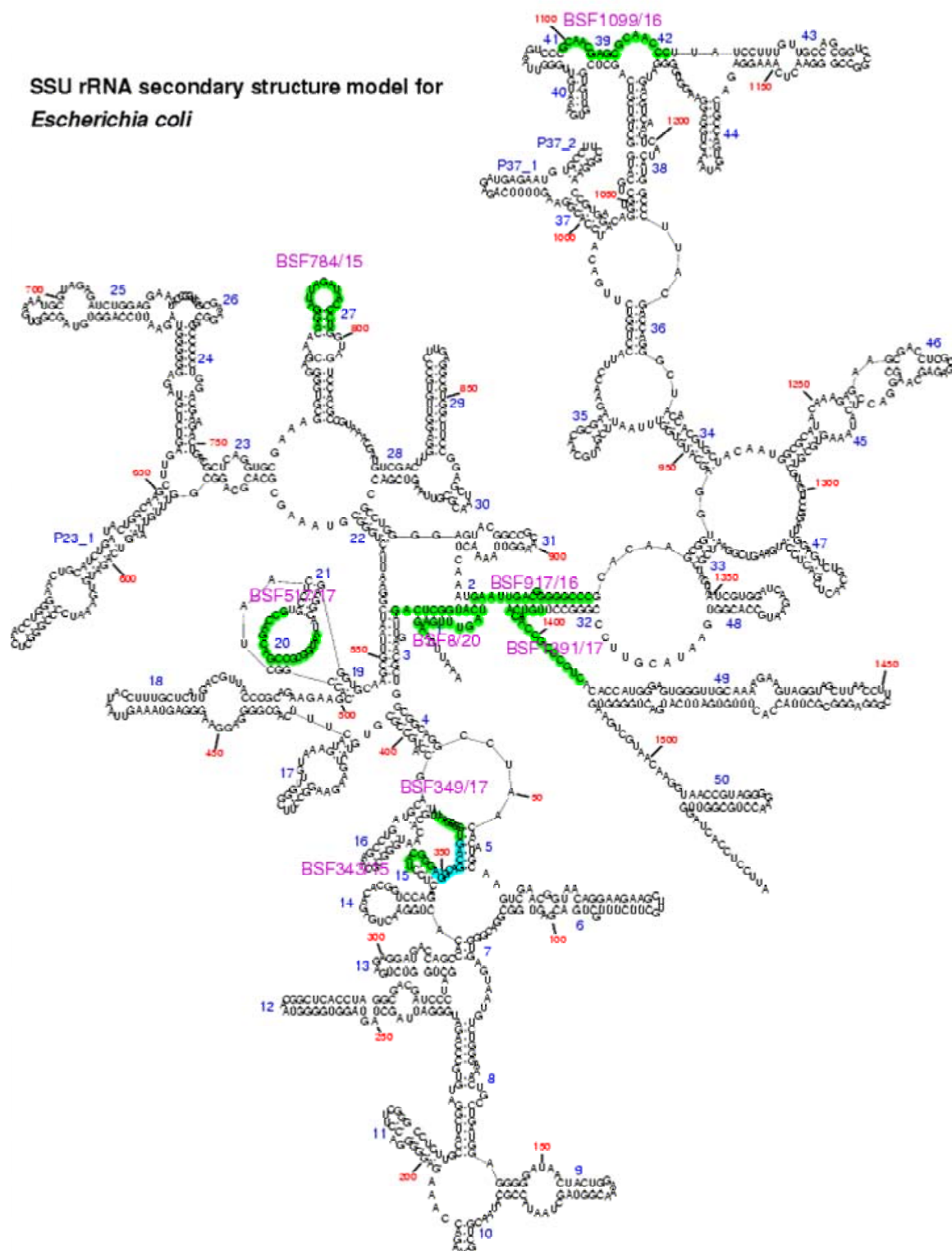


Figure S.4 : Structure secondaire de la molécule d'ARNr16S (*E. Coli*).

Tant que les critères de forme et de composition chimique étaient seuls disponibles, l'évolution des espèces bactériennes est restée d'accès difficile. La mesure de la composition en bases de l'ADN (le contenu en G+C) est venue s'ajouter aux critères de discrimination des espèces. Empiriquement, deux organismes appartenant à la même espèce présentent une divergence en $G+C \leq 5 \text{ mol } \%^*$. Cependant, une composition identique en bases n'indique pas nécessairement une identité de séquence, aussi la similarité entre deux génomes a été déterminée par des expériences d'hybridation ADN-ADN. Le degré de similarité existant entre deux génomes d'organismes, affiliés à la même espèce, indique un minimum de 70%. Cette valeur seuil est corrélée à une ΔT_m^\dagger de 5°C au plus. Les hybrides résultant du croisement d'un seul génome forment des structures stables au T_m élevé, la stabilité des hybrides issus d'un croisement hétérologue, dépend du degré de parenté liant les deux organismes (**Rossello-Mora et Amann, 2001**).

Les notions fondamentales de l'utilisation des séquences pour bâtir une taxonomie des microorganismes fondée sur une filiation évolutive, et non plus sur les caractères phénotypiques, émanent de la revue publiée en 1987 par **C. R. Woese**. La macromolécule choisie, l'ARN ribosomal 16S (ARNr16S), répond aux critères essentiels : elle est présente et remplit le même rôle chez toutes les espèces, l'ADNr16S est séquençable par des méthodes standards suffisamment rapides et ce gène évolue lentement. L'ARNr16S est une macromolécule constitutive de la sous unité 30S du ribosome procaryote. D'une longueur d'environ 1500 paires de bases, l'ADNr16S est un gène ubiquitaire qui possède une structure en mosaïque, composée de régions conservées et de régions variables (Figure S.4). L'analyse comparative de ces régions permet d'identifier et de différencier les bactéries au sein de l'écosystème microbien. Le gène codant pour l'ARNr16S a également la particularité de n'être soumis à aucun transfert latéral de matériel génétique entre microorganismes. Au vu de l'ensemble de ces caractéristiques l'ARNr16S constitue un bon marqueur génétique dans les études d'affiliation phylogénétique. L'identification et l'exploitation des séquences signatures de la molécule d'ARNr16S à l'aide d'outils bioinformatiques constituent la suite logique d'une approche moléculaire en écologie microbienne. Actuellement plus de 100000 séquences alignées d'ADNr16S sont accessibles dans les bases de données RDP (*Ribosomal Database Project*, <http://rdp.cme.msu.edu>) et NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nih.gov/>). Les séquences référencées regroupent des séquences d'ARNr16S obtenues à partir de souches bactériennes cultivées et de clones environnementaux

* $\text{Mol}\%GC = (GC/(GC+AT)) \times 100$

† T_m = "melting temperature" = Température de fusion. ΔT_m reflète la stabilité thermique des hybrides ADN-ADN formés lors de l'association des ADN simples brins

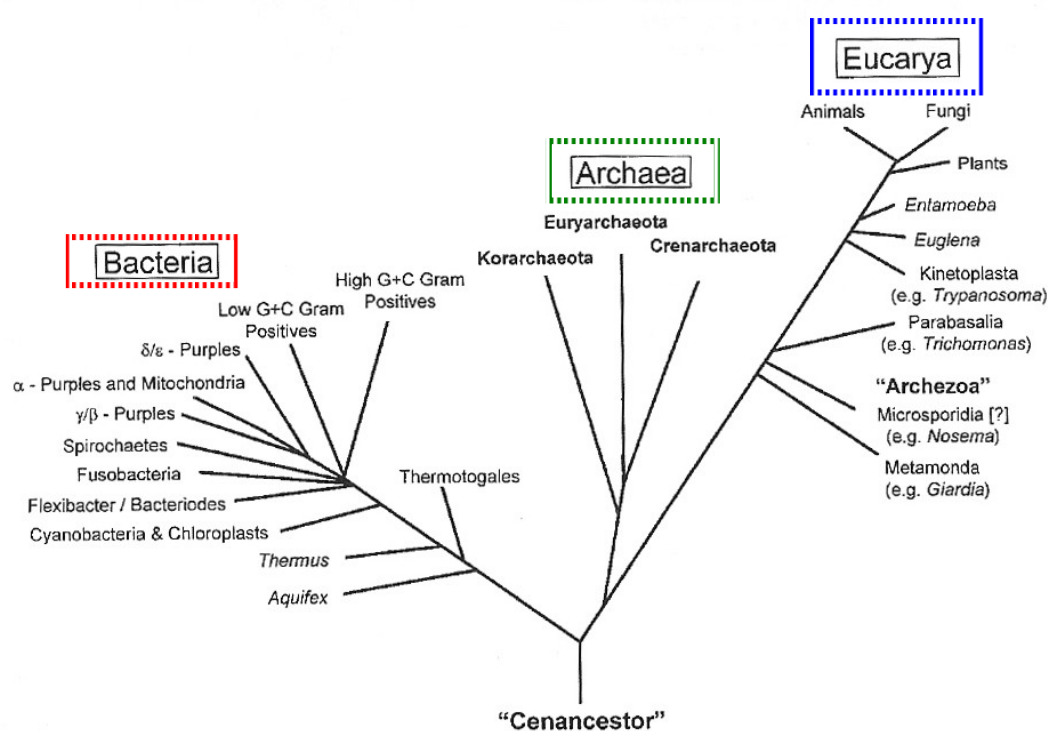


Figure S. 5: Représentation de l'arbre ARNr universel mettant en évidence les positions relatives des trois domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. La localisation de la racine (Cenancestor) correspond aux propositions des différentes phylogénies (Brown et Doolittle 1995).

L'alignement comparatif des séquences d'ADNr16S permet de déterminer leur pourcentage de similarité. **Stackebrandt et Goebel (1994)** ont établi que les génomes d'organismes procaryotes similaires à plus de 70 % partageaient une similarité de séquences d'ADNr16S supérieure à 97 %. Ce seuil de 97 % discriminant deux espèces est une valeur de référence en écologie microbienne. Dans le cadre de la caractérisation phylogénétique des communautés microbiennes d'un écosystème par une approche de clonage de l'ADNr16S, les séquences alignées par positions oligonucléotidiques homologues sont regroupées en OTUs[‡] ou espèces moléculaires au sein de l'arbre phylogénétique. Cette unité taxonomique, regroupant un ensemble de séquence d'ADNr16S dont le pourcentage de similarité 2 à 2 est supérieur à 97 %, définit un ensemble de clones affiliés à une même espèce.

II.A.2.L'arbre évolutif procaryote.

La classification des procaryotes est longtemps restée très chaotique, **C. R. Woese (1987)** a permis de clarifier les relations entre les différents types bactériens et l'arbre phylogénétique qu'il a proposé était fondé sur une première analyse d'une soixantaine de séquences ADN16S d'isolats microbiens. Le trait dominant est le partage du monde biologique non plus en deux (Eucaryotes et Bactéries) mais en trois grands règnes : les *Eucarya*, et deux domaines procaryotiques, les *Eubacteria* et les *Archaea* (Figure S. 5). Cette division met en lumière la grande distance évolutive entre deux êtres vivants appartenant à des règnes différents. En définitive, l'homme est beaucoup plus proche d'un plant de maïs que le colibacille ne l'est d'une *Archaea* méthanogène. Les études phylogénétiques, ont permis d'établir "objectivement" les relations de parenté entre les microorganismes, et les arbres phylogénétiques résultant de l'analyse des séquences ARNr permettent d'articuler le concept relativement évasif de biodiversité.

En utilisant l'approche ARNr pour les études d'écologie microbienne, les scientifiques tentent d'obéir à une des règles d'or de la biologie formulée par **Dobzhansky en 1937** “*Nothing in biology makes sense without evolution*”. Cependant, les phylogénies basées sur l'ARN ribosomal sont-elles réellement informatives quant aux processus évolutifs ? Les récentes études de reconstruction phylogénétique à partir de l'intégralité du génome (**Snel et al. 1999**) semblent suggérer que les phylogénies ARNr présentent deux problèmes majeurs : elles révèlent seulement une partie de la complexité de l'évolution cellulaire, et elles sont sujettes à de fréquentes erreurs de positionnement phylogénétique résultant de la taille réduite de la molécule ARNr. Cette résolution insuffisante peut conduire à des associations erronées entre des lignées présentant des évolutions rapides (**Philippe**

[‡] OTUs : *Operationnal Taxonomic Units*

et Laurent 1998) ou encore à des positionnements incorrects de lignées ancrées précocement au sein de l'arbre phylogénétique (Ludwig et Klenk 2001, Philippe et Laurent 1998).

En dépit des aspects critiquables des phylogénies ARNr16S, ces dernières restent largement utilisées par les scientifiques car elles permettent de définir un cadre universel d'étude de la biodiversité. D'autre part, les populations cellulaires environnementales apparaissent, dans la grande majorité des études, en accord avec les séquences ARNr. Ainsi, si les limites inhérentes à ces analyses phylogénétiques sont considérées et admises, les séquences ADNr16S constituent majoritairement de bons marqueurs génétiques (Rappé et Giovannoni 2003).

II.B. La "signification" de la biodiversité.

Dès 1985, Pace et ses collaborateurs ont suggéré que la diversité microbienne "non-cultivée" pourrait être explorée par des approches de biologie moléculaire (Olsen *et al.* 1986, Pace *et al.* 1986). Si les premiers pas furent laborieux, le concept clé était néanmoins établi : les microorganismes pouvaient être identifiés sans mise en culture en isolant et en séquençant les macromolécules directement à partir de l'environnement, et des sondes oligonucléotidiques pouvaient être créées et utilisées pour identifier et quantifier *in-situ* les différentes cellules procaryotes (Amann *et al.* 1995, Ward *et al.* 1992). La majorité des nouvelles technologies développées dans ce contexte ont été basées sur la phylogénie moléculaire de l'ARNr, particulièrement de la sous unité ribosomale 16S. Si ces technologies ARNr16S ont drastiquement (et positivement !) modifié la vision du domaine procaryotique, elles ont cependant conduit à promouvoir la notion de l'incultivabilité de la grande majorité des espèces procaryotiques [*"only a small fraction of less than 1% of the cells observed by microscopy (i.e., in natural sources) can be recovered as colonies on standard laboratory media"* (Amann 2000), *"Molecular phylogenetic techniques have provided methods for characterizing natural communities without the need to cultivate organisms"* (Hugenholtz et Pace 1996)]. Certains auteurs ont également suggéré que les études basées sur l'ARNr pouvaient permettre d'accéder aux traits phénotypiques des microorganismes : *"the types and numbers of organisms in natural communities can be surveyed by sequencing rRNA genes obtained from DNA isolated directly from cells in their ordinary environments. Analyzing microbial communities in this way is more than a taxonomic exercise because the sequences can be used to develop insights about organisms"* (Pace 1996).

L'analyse de la variabilité des séquences ARNr, permet d'aborder la diversité taxonomique en référence à la question *"Qui sont-elles?"* et de définir des relations évolutives entre les microorganismes. Cependant, nombre d'informations clés ne sont pas accessibles par ces phylogénies, par exemple, *"Quelles innovations avantageuses des fonctions cellulaires ont été*

sélectionnées par l'évolution ?" Ou encore *"Quelles activités biochimiques réalisées par les microorganismes influencent les cycles d'éléments à l'échelle de l'écosystème ou de la biosphère ?"*

Le terme "diversité" possède plusieurs sens qui ne sont pas uniquement associés à la notion de relation évolutive ou phylogénie, et, s'il est vrai que les méthodes culturales présentent d'indéniables biais et sont extrêmement "chronophages", promouvoir le concept de l'incultivabilité irrémédiable de la très grande majorité des microorganismes de l'environnement a conduit à une perte significative d'informations. Notre compréhension du rôle des bactéries dans les cycles naturels est basée, en grande partie, sur la caractérisation des activités biochimiques d'isolats de microorganismes anaérobies ou aérobies, en d'autres termes sur leurs traits phénotypiques qui définissent la diversité biochimique ou diversité métabolique. Il ne peut y avoir, en aucune façon, une caractérisation de la diversité biochimique par les informations fournies par l'analyse des gènes ARNr. Une analyse détaillée de la signification de la biodiversité du monde procaryotique a été réalisée par **Palleroni (1997)** et ses conclusions sont les suivantes : *"Modern approaches based on the use of molecular techniques presumed to circumvent the need for culturing prokaryotes, fail to provide sufficient and reliable information for estimation of prokaryotes diversity. Many properties that make these organisms important members of the living world are amenable to observation only through the study of living cultures. Since current culture techniques do not always satisfy the need of providing a balanced picture of the microflora composition, future developments in the study of bacterial diversity should include improvements in the culture methods to approach as closely as possible the conditions of natural habitats. Molecular methods of microflora analysis have an important role as guides for the isolation of new prokaryotic taxa"*.

Depuis les années 1980, l'intérêt de la communauté scientifique pour le monde procaryotique a été indéniable. L'ensemble des informations acquises en terme de biomasse procaryotique et de diversité taxonomique ont créé la vision que les écologistes microbiens ont actuellement du monde procaryotique, à savoir : de vastes et diversifiées populations de microorganismes ayant des origines évolutives très précoces mais dont les activités spécifiques restent énigmatiques. En effet, peu d'études des communautés bactériennes ont eu comme question directrice *"Que font-elles ?"* et les connaissances des principales réactions biologiques impliquées dans les cycles biogéochimiques n'ont pas considérablement évolué. La recherche de voies auxiliaires de cycles chimiques catalysées par les bactéries reste un domaine largement inexploré, malgré une diversité insoupçonnée de processus bioénergétiques.

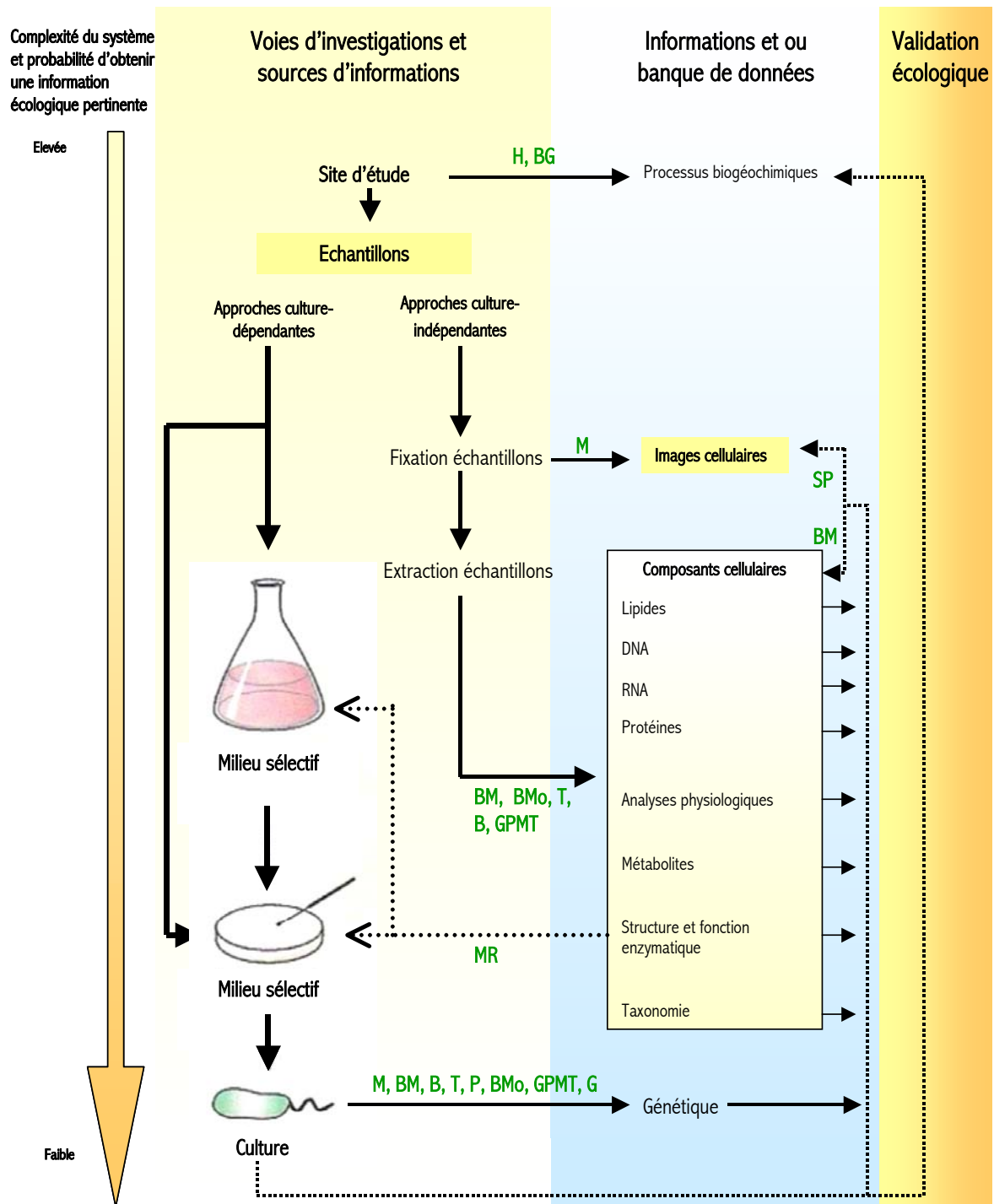


Figure S. 6 : Modèle conceptuel pour l'acquisition et l'interprétation des informations en microbiologie environnementale. La colonne 1 fournit une échelle pour évaluer la pertinence de l'information proposée dans les trois autres colonnes. La colonne 2 présente une liste des différentes procédures microbiologiques pouvant permettre d'acquérir des informations sur les microorganismes de l'environnement. Les colonnes 3 et 4 présentent respectivement le type d'informations générées par les différentes procédures méthodologiques et les principales voies d'investigations rétroactives pouvant être utilisées pour valider la pertinence écologique des données microbiologiques.

B : caractérisation biochimique, BG : Biogéochimie, BM : Biomarqueurs, BMo : caractérisation moléculaire (ex : clonage séquençage), G : caractérisation génétique, H : Historique, M : Microscopie, MR : amélioration des conditions de culture, GPMT : génome-protéome-métabolome-transcriptome, P : caractérisation physiologique, SP : sondes pour microscopie (immuno et GPMT), T : caractérisation taxonomique. D'après Madsen 2005.

III- CARACTERISER LA DIVERSITE FONCTIONNELLE : LE "CHALLENGE" DES ANNEES 2000?

« *Identifying ecologically significant microorganisms is like finding a needle in an unusual haystack- a haystack with individual pieces that can, during the search, change into misleading needles* ». Madsen (2005).

A partir de ses études sur *Bacillus anthracis*, **Robert Koch** développe en **1884** le concept connu sous le terme de postulat de Koch. Celui-ci, qui régit l'identification des agents responsables de pathologie en microbiologie clinique, stipule qu'un microorganisme particulier (*Bacillus anthracis*) est responsable d'un processus spécifique (pathologie de l'anthrax) dans un habitat défini (mouton). Cependant, pour les microbiologistes concernés par les problématiques environnementales, relier l'identité d'un microorganisme à une activité et un habitat spécifiques apparaît difficile. A l'échelle de l'écosystème, l'identification des rôles spécifiques des microorganismes nécessite d'appréhender les mécanismes relationnels entre les différents paramètres de l'habitat, les pressions évolutives, la diversité microbienne, les processus biochimiques et leurs contrôles génétiques. Depuis plus d'un siècle les écologistes microbiens ont été confrontés à de nombreux défis : aborder l'immense diversité microbienne, les réponses des populations aux paramètres biotiques et abiotiques, la compréhension du rôle des microorganismes dans des environnements ouverts, complexes, hétérogènes et dynamiques. Les récents progrès réalisés dans les domaines de la bioinformatique, et des stratégies d'investigation rétroactives apportent une nécessaire complémentarité avec les informations générées par les approches culturelles et non culturelles (Figure S.6).

En renforçant et en élargissant le modèle construit sur le postulat de Koch, les recherches actuelles et futures vont très certainement permettre de relier l'importance écologique des microorganismes et leurs activités au sein de leur habitat. Outre l'aspect fondamental et l'enjeu scientifique qu'elle revêt, la volonté d'accéder à ces informations fonctionnelles reflète également les attentes du public et des instances gouvernementales résultant de la prise de conscience de la fragilisation de notre planète (Sugden *et al.* 2003). En effet, les processus microbiens dans les sols, les océans, les lacs, les sédiments, et les eaux souterraines ont une influence primordiale sur la qualité de l'environnement, l'agriculture et les changements climatiques globaux. De nombreuses approches ont été développées pour palier le manque de données sur les fonctions des microorganismes environnementaux (Figure S. 6). Ces informations visent avant tout à retracer des voies métaboliques cellulaires et à analyser des flux de composés au sein de réseaux ou de consortia microbiens. De même, les méthodes d'écologie moléculaire ont évolué de la génomique à la transcriptomique et à la protéomique avec pour objectifs de caractériser des potentialités métaboliques et des processus *in situ*. Quelques exemples (non exhaustifs) de ces nouvelles approches seront cités afin de mettre en évidence les capacités méthodologiques

actuelles d'études fonctionnelles *in situ*. Si l'accès à ces informations est capital pour la compréhension du rôle écologique des microorganismes dans leur environnement, il n'en demeure pas moins que l'observation de microorganismes vivants est une voie primordiale (et à ne pas négliger !) pour obtenir des informations sur la diversité physiologique ou biochimique ou pour caractériser de nouvelles voies métaboliques.

III.A. L'utilisation des isotopes stables ou techniques SIP §

L'exploitation des propriétés physiques des atomes, constituants de tous les composants cellulaires, se révèle une voie d'étude prometteuse. Les méthodologies basées sur les isotopes stables (SIP), particulièrement sur les isotopes du carbone, permettent d'identifier des processus biologiques mais également les microorganismes impliqués. Ainsi, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie phase gazeuse (GC-MS), de même que la GC-IRMS** sont des outils hautement résolutifs pour suivre les flux de composés organiques à l'échelle moléculaire. Le couplage des isotopes stables avec des biomarqueurs lipidiques et/ou des études moléculaires de l'ADN ou de l'ARN apparaît comme une voie particulièrement intéressante pour identifier les espèces impliquées dans les cycles biogéochimiques dans les écosystèmes naturels (Figure S. 7).

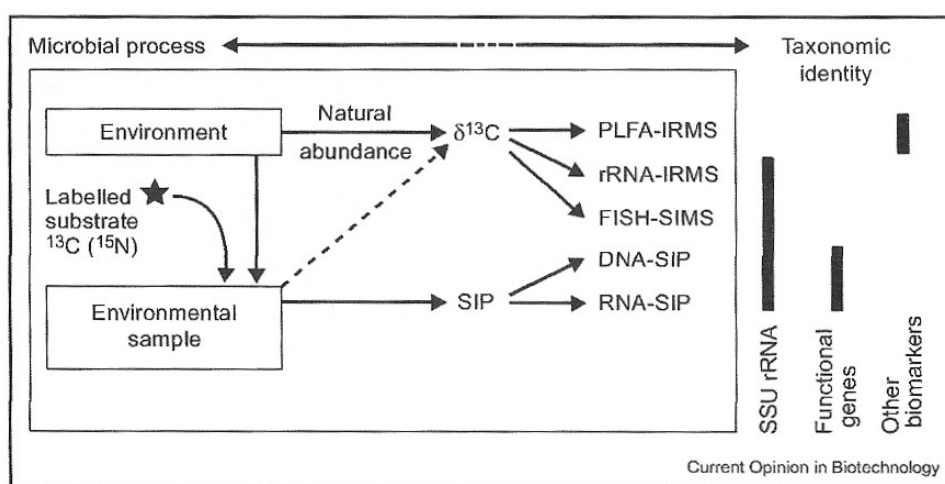


Figure S. 7: Diagramme schématisant l'utilisation des isotopes pour relier le processus écologique et l'identification du microorganisme impliqué (d'après Radajewski *et al.* 2003). PLFA : Phospholipid fatty acid, IRMS : Isotope ratio mass spectrometry, SIP : Stable isotope probing.

§ SIP : Stable Isotope Probing

** GC-IRMS: Gas chromatography-Isotope ratio mass spectrometry

Composés de référence	Structure	Distribution
AG saturés	16:0	<i>Bacteria, Eucarya</i>
	12:0	<i>Eucarya</i>
	18:2 ω 6c	Champignons, algues, protozoaires
AG polyenoïques	18:3 ω 3c	Cyanobactéries
	18:3, 20:3, 20:4	Microeucaryotes, champignons, algues marines
	20:5 ω 3	Mycorhizes
	20:3 ω 6, 20:4 ω 6, 20:5 ω 3	<i>Shewanella spp.</i> (psychrophile)
	Polyinsaturés >C ₂₀	Microeucaryotes, diatomées
	22:6	<i>Eucarya</i>
	22:6 ω 3	Dinophycées
	16:1 ω 7c, 16:1 ω 7t, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 6, 17:1 ω 9, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 7t, cy17:0, cy19:0	<i>Colwellia psychrerythraea</i>
	16:1 ω 7, 18:1 ω 7	Bactéries Gram-négatives
	16:1 ω 7, 18:1 ω 7, 18:1 ω 9	Bactéries thio-oxydantes
	16:1 ω 8c, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5t, 18:1 ω 5c	<i>Eucarya</i>
AG monoenoïques	16:1 ω 5c	Méthanotrophes de type I (<i>Methylomonas</i> , <i>Methylococcus</i>)
	16:1 ω 13t	Mycorhizes
	15:1 ω 6, 17:1 ω 6	Photosystème I
	18:1 ω 8c	<i>Desulfobulbus spp.</i>
		Méthanotrophes de type II (<i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i>)
AG ramifiés en position terminale	il4:0, il5:0, al5:0, il6:0, il7:0, al7:0	<i>Arthrobacter spp.</i> , et autre bactéries Gram-positives, bactéries sulfato-réductrices Gram-négative, (ex : <i>Desulfovibrio spp.</i>)
		<i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i>
AG ramifiés en position médiane	10me16 :0	<i>Desulfobacter spp.</i>
	10me16:0, 10me18 :0	Actinomycètes
AG monoenoïques ramifiés	il7:1 ω 7c	<i>Desulfovibrio spp.</i>
		<i>Syntrophobacter wolinii</i> , <i>Syntrophobacter pfennigii</i>
AG hydroxylés	3-OH	Bactéries Gram-négatives
Acide mycolique	B-OH, α -ramifié	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>
	Caldarchaeol	<i>Archaea</i> hyperthermophiles, quelques méthanogènes
Isoprenoïde glycerol ether	Archaeol	Méthanogènes, Halophiles extrêmes
	α -, β -hydroxyarchaeol	Méthanosarcinales
	Ergostérol	Champignon
Stérols	Sitostérol	Plantes supérieures
	Cholestérol	Animaux
Hopanoïdes	Bacteriohopanetetrol, aminobacteriohopanetetrol	<i>Eubacteria</i>
Benzoquinones	Ubiquinones, Coenzyme Q	Bactéries Gram-négatives aérobies
Naphthoquinones	Menaquinones, dimethylmenaquinone	Bactéries Gram-positives aérobies, Bactéries Gram-négatives anaérobies, halophiles extrêmes

Tableau S. 1 : Compilation des signatures lipidiques des bactéries et leurs distributions.

Nomenclature : ':', nombre d'insaturations, ' ω ', distance entre la première insaturation et le groupement méthyle terminal, 'c' ou 't', isomères géométriques cis ou trans des insaturations, 'i' ou 'a', ramifications iso ou anteiso, 'cy', groupement cyclopropyl, 'me', position du groupement méthyle.

D'après Spring *et al.* 2000

III.A.1. Les biomarqueurs lipidiques et les isotopes stables.

Les lipides sont des composants primordiaux du matériel cellulaire, particulièrement des membranes procaryotiques, et leur utilisation en tant que biomarqueurs résulte de leurs spécificités. Ces molécules ont ainsi été utilisées pour analyser la structure et la dynamique des communautés microbiennes au sein des écosystèmes (Boone *et al.* 1996, Oude Elferink 1998), pour suivre l'évolution de ces dernières en réponse à un stress environnemental (Findlay *et al.* 1990), ou encore pour évaluer la biomasse bactérienne dans des écosystèmes complexes en déterminant la concentration en PLFA^{††} (Balkwill *et al.* 1988, Green et Scow 2000). Ces molécules sont structuralement diverses (Tableau S. 1) et exhibent un degré de spécificité biologique relativement élevé (Spring *et al.* 2000). D'autre part, les microorganismes hétérotrophes présentant un rapport isotopique ¹³C/¹²C identique à celui du substrat utilisé, l'analyse des signatures isotopiques de ces biomarqueurs lipidiques peut permettre de déterminer les sources de carbone impliquées dans des processus bioénergétiques microbiens.

Cet outil a ainsi permis la mise en évidence du processus de réoxydation anaérobie du méthane (OAM) dans les sédiments marins. Le méthane présente un appauvrissement naturel très net en ¹³C en comparaison des composés organiques ($\delta^{13}\text{C}$ entre -50 et -110 ‰, Whiticar *et al.* 1986). L'observation de bactéries sulfato-réductrices (BSR) et d'*Archaea* présentant des biomarqueurs spécifiques extrêmement appauvris en ¹³C a suggéré que le processus OAM était réalisé *via* un couplage syntrophique impliquant un consortium de BSR et d'*Archaea*, hypothèse confirmée secondairement par différentes études (Boetius *et al.* 2000, Orphan *et al.* 2001 a). Au contraire du méthane, naturellement appauvri en ¹³C, la majorité des composés carbonés présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ comprises entre -20 et -35‰ (Freeman *et al.* 1990), rendant complexe le suivi du métabolisme carboné de microorganismes spécifiques. Néanmoins, des résultats prometteurs pour affiner le lien entre les populations microbiennes et leurs fonctions au sein de cycles biogéochimiques spécifiques ont été récemment obtenus. L'approche générale est l'utilisation de substrat enrichi en ¹³C pour retracer les voies métaboliques et identifier les communautés impliquées. Boschker *et al.* (1998) ont, par exemple, utilisé le marquage au ¹³C pour étudier le rôle central de l'acétate dans la dégradation de la matière organique. L'analyse par GC-IRMS de l'incorporation d'acétate ¹³C dans les PLFA de BSR a révélé que la sulfato-réduction acétoclastique dans ces sédiments estuariens était la résultante de l'activité de BSR affiliées au groupe des bactéries Gram-positives *Desulfotomaculatum acetoxidans* et non de celle de la population la plus largement représentée de Gram-négative, *Desulfobacter spp.* D'autres applications peuvent être

^{††} PLFA : ester-linked phospholipid fatty acids

[‡] $\delta = [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ échantillon}) / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ standard}) - 1] \times 1000$

Elements that constitute nucleic acids and some properties that are important for SIP.					
Nucleotide unit	H	C	N	O	P
Number of atoms per nucleotide unit in DNA					
B-D-2-deoxyribose backbone	7	5	0	5	1
(A) Deoxyadenylate	11	10	5	5	1
(G) Deoxyguanylate	11	10	5	6	1
(T) Deoxythymidylate	12	10	2	7	1
(C) Deoxycytidylate	11	9	3	6	1
Isotope natural abundance (atom %)					
Light stable isotope	(¹ H) 99.99	(¹² C) 98.93	(¹⁴ N) 99.63	(¹⁶ O) 99.76	(³¹ P) 100
Heavy stable isotope	(² H) 0.01	(¹³ C) 1.07	(¹⁵ N) 0.37	(¹⁷ O) 0.04 (¹⁸ O) 0.2	

Tableau S. 2 : Eléments constitutifs des acides nucléiques et quelques propriétés importantes pour les méthodes SIP.

D'après Radajewski *et al.* 2003

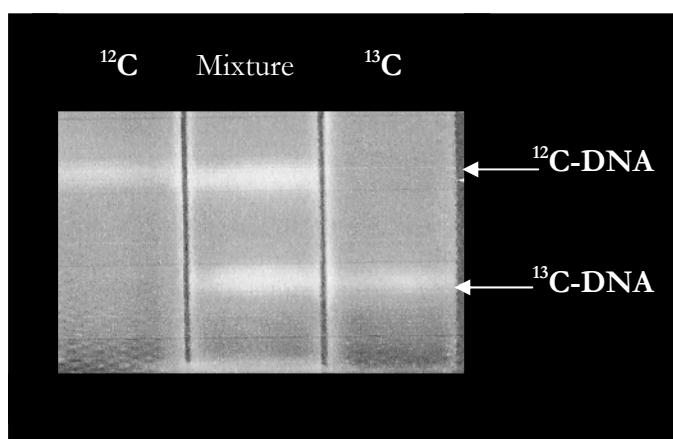


Figure S. 8: Centrifugation en gradient de CsCl/bromure d'éthidium d'ADN marqué. Echantillons individuels et combinés d'ADN extrait de *Methylosinus trichosporium* OB3b sur du méthane marqué en ¹²C et ¹³C comme seule source de carbone, d'après Radajewski *et al.* 2003

envisagées pour cette méthodologie, notamment dans les études de biodégradation de composés toxiques (Hanson *et al.* 1999).

III.A.2. Les acides nucléiques et les isotopes stables.

DNA-SIP : Les différents isotopes des atomes constitutifs des nucléotides (hydrogène, carbone, azote, oxygène, phosphore) sont intégrés au sein de la molécule d'ADN en fonction de leurs abondances naturelles (Tableau S. 2, Radajewski *et al.* 2003). L'utilisation de substrat marqué (^{13}C par exemple), conduit à l'incorporation d'une grande quantité d'un isotope stable dans l'ADN et ainsi à une différence de densité entre les molécules d'ADN des fractions microbiennes ayant incorporé ce substrat (fractions marquées) et des fractions non marquées. La séparation des 2 fractions (ADN lourd (marqué), et ADN léger (non marqué)) est réalisée par centrifugation en gradient de densité, Figure S. 8). Le marquage du chromosome bactérien par des isotopes stables permet d'isoler la copie intégrale des génomes des communautés microbiennes. Il est ainsi possible d'accéder secondairement, par des technologies PCR-dépendantes, à l'identification phylogénétique des groupes potentiellement impliqués dans le métabolisme ciblé mais également à la détection et au clonage de gènes de fonctions codant pour des enzymes spécifiques. Radajewski *et al.* (2000) ont appliqué la méthodologie DNA-SIP à l'étude du processus de méthyliotrophie : du méthanol marqué ($^{13}\text{CH}_3\text{OH}$) a été incorporé dans des échantillons naturels de sol forestier et il est apparu que des membres de la division des *Acidobacteria* étaient responsables de la dégradation du méthanol dans cet environnement. Les *Acidobacteria* sont un groupe diversifié et largement distribué, dont quelques représentants sont cultivés, mais aucune fonction de méthyliotrophie n'avait précédemment été détectée au sein de ce groupe.

L'outil DNA-SIP permet de discriminer, d'identifier des populations microbiennes impliquées dans un métabolisme particulier, et de cibler des gènes d'intérêt. L'incorporation de substrat marqué au sein des acides nucléiques implique également que les microorganismes détectés soient métaboliquement actifs. Certaines limites sont cependant inhérentes à cette méthode : des périodes d'incubation relativement longues (supérieures à 40 jours, Radajewski *et al.* 2000) sont nécessaires et peuvent conduire à la formation de métabolites intermédiaires marqués, assimilables par des microorganismes non ciblés initialement ("cross-feeding"). Ces temps d'incubation peuvent également entraîner des modifications dans la structure des communautés, biaisant les résultats obtenus. Cette méthodologie n'est d'autre part actuellement applicable qu'à un petit nombre de substrats.

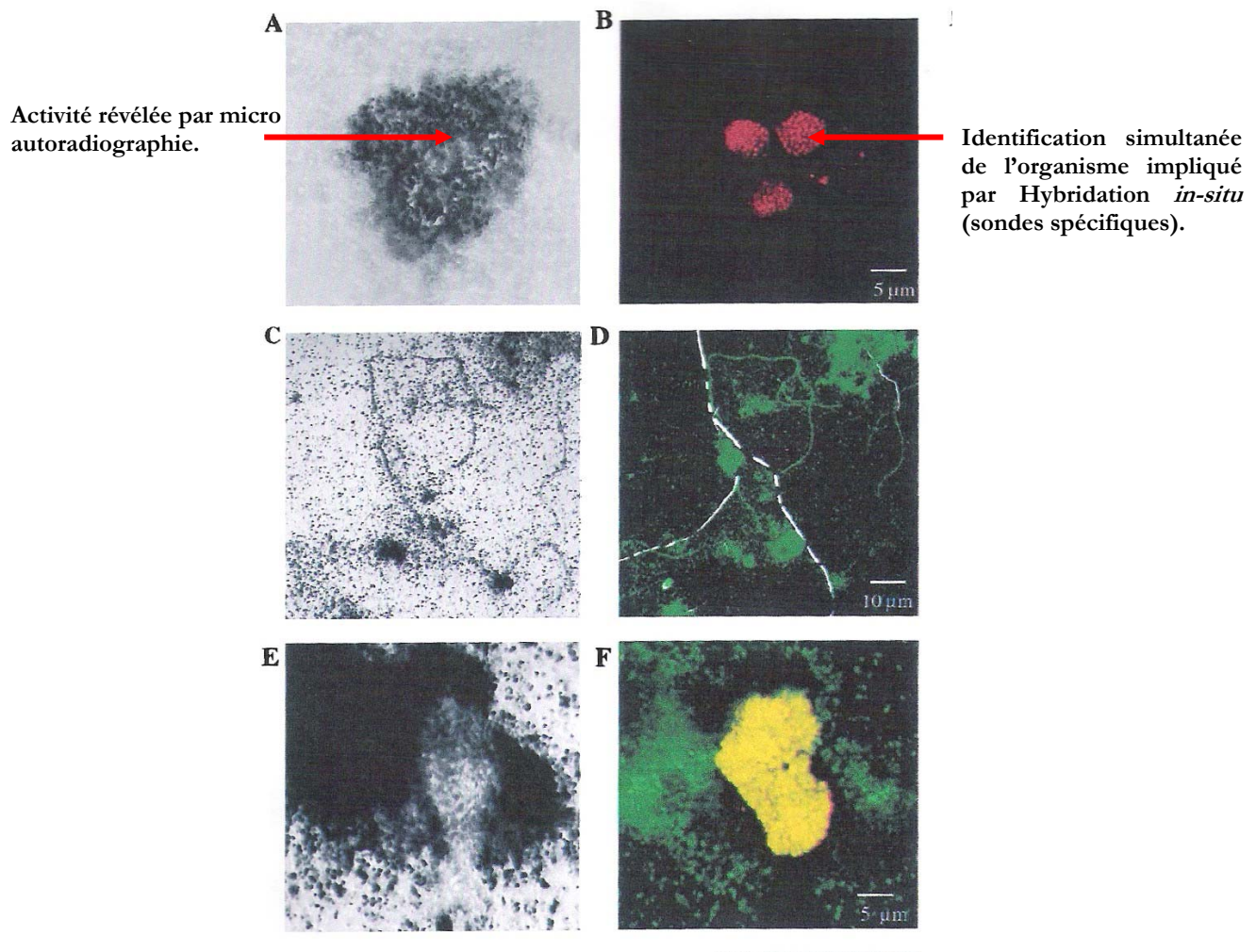


Figure S. 9: Exemples d'images obtenues par la méthode microFISH (d'après Lee *et al.* 1999).

RNA-SIP : L'ARN pourrait constituer un marqueur plus sensible que l'ADN pour l'application de la méthodologie SIP (Manefield *et al.* 2002). Dans les cellules métaboliquement actives, le taux de synthèse de l'ARN est très élevé, d'autre part, le marquage peut se réaliser sans synthèse d'ADN et donc sans réplication de l'organisme. La méthode RNA-SIP basée sur le transcriptome des microorganismes actifs ciblés permet ainsi l'amplification directe de la molécule d'ARNr. En outre, le marquage des molécules d'ARN apparaît plus rapide que celui de l'ADN au sein de la

communauté microbienne (**Manefield et al. 2002**) suggérant que l'ARN-SIP présente une sensibilité accrue en permettant de réduire les concentrations en substrat marqué et les temps d'incubation.

III.B. Combinaison des méthodes de micro autoradiographie et d'Hybridation *in situ* (FISH^{§§}): MicroFISH

L'utilisation de substrats radio marqués en combinaison avec l'autoradiographie a été appliquée à de nombreuses études environnementales pour mesurer l'activité de micro algues, de procaryotes autotrophes ou hétérotrophes (**Carman 1993**). Les limites majeures de ces approches résidaient dans leur inaptitude à corréler l'activité détectée et l'organisme impliqué. Ce problème a été récemment résolu en combinant l'autoradiographie avec la méthode FISH (**Lee et al. 1999**). Cette dernière, classique en écologie microbienne, permet d'identifier et d'énumérer des microorganismes *in situ* à différents niveaux de résolution taxonomique (**Fuhrman et al. 1998**). Certaines sondes oligonucléotidiques sont universelles (Eubactéries ou *Archaea*), d'autres sont spécifiques de niveaux taxonomiques intermédiaires (exemple : *α-Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium*), d'espèces ou de sous-espèces. L'association de ces deux méthodes permet d'accéder à l'identification des organismes impliqués dans l'utilisation de substrats spécifiques au sein d'une communauté microbienne complexe et pour différentes conditions d'incubation (Figure S. 9). Les informations obtenues par MicroFISH peuvent également permettre le développement de nouvelles stratégies d'isolement de bactéries initialement incultivables.

III.C. Transcription reverse (RT-PCR) de l'ARN messager

L'amplification spécifique et la caractérisation des transcrits ARN messagers extraits de l'environnement apparaît comme une stratégie prometteuse pour déterminer l'activité de microorganismes spécifiques dans leur environnement. Cette approche est entièrement basée sur la caractérisation des acides nucléiques et offre l'avantage de ne pas introduire de substrats marqués et donc d'éviter les biais résultant des longues périodes d'incubation. Les cibles pour la RT-PCR incluent les transcrits des gènes codant pour des enzymes présentant une fonction clé dans les métabolismes microbiens (Ex : ammonium monooxygénase, **Horz et al. 2000**, sulfite réductase, **Wagner et al. 1998**) ou impliqués dans la dégradation de composés xénobiotiques (ex: naphthalène dioxygénase, **Wilson et al. 1999**). La diversité des séquences des gènes codant pour des protéines homologues dans différents groupes taxonomiques peut être utilisée pour l'affiliation des transcrits dans différents groupes phylogénétiques. Deux limites majeures contraignent néanmoins cette

^{§§} FISH : Fluorescent *in situ* hybridization

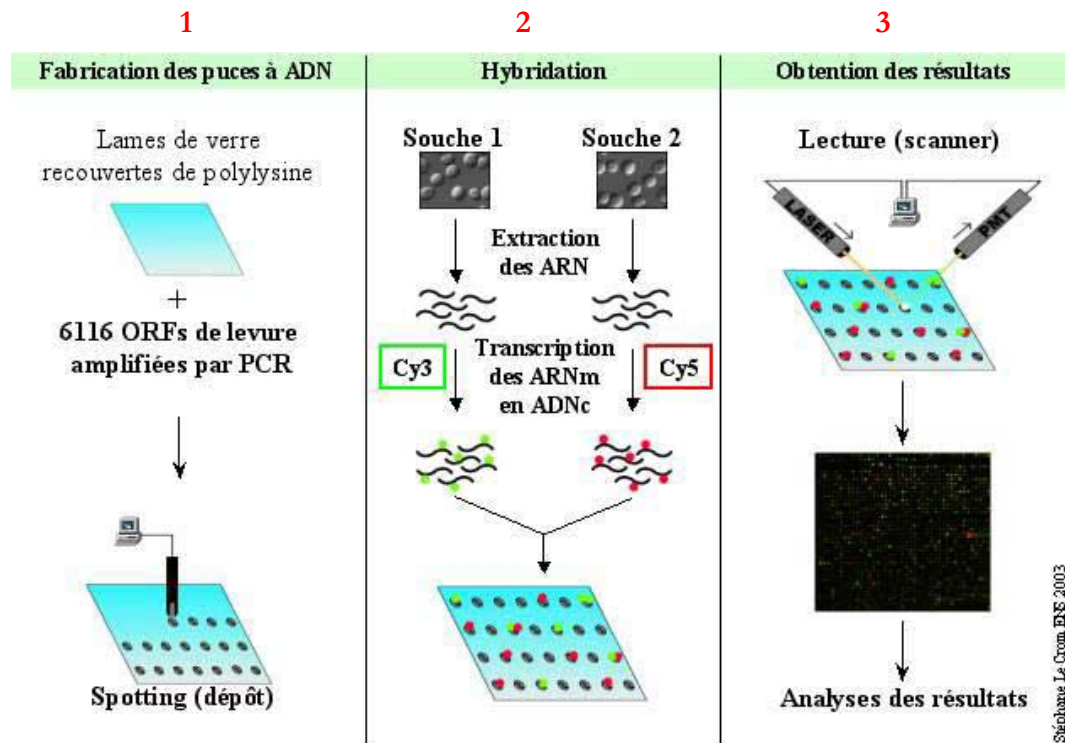


Figure S. 10 : Principales étapes de la technologie microarray. Exemple sur l'expression différentielle de gènes chez deux souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). ORF : open reading fragment, ADNc : ADN complémentaire.

(1) La fabrication de la puce: Les fragments d'ADN amplifiés par PCR (appelés sondes) sont déposés sur une lame de verre. Ces sondes peuvent être, comme dans l'exemple, la partie exprimée de gènes (ORFs*) mais également des sondes ADNr16S dans le cas de puces phylogénétiques. Juste avant l'hybridation, l'ADN est dénaturé (Figure S.11) afin qu'il soit sous forme simple brin sur la puce. Ceci permettra son hybridation avec le brin complémentaire contenu dans la cible. (2) La préparation de la cible: Les ARN sont extraits des cultures (levures dans l'exemple) ou d'échantillons naturels (eau, sol...) et transformés en ADNc* par transcription inverse (RT-PCR). Dans l'exemple choisi, l'ADN de la première culture est marqué avec un fluorochrome vert (Cy3), tandis que l'ADN de la seconde culture est marqué en rouge (Cy5). (2) L'Hybridation: Les ADN marqués en vert et ceux marqués en rouge sont mélangés (constituent la cible) et placés sur la matrice d'ADN simple brin déposée (sondes). Après incubation, les cibles rencontrant la sonde complémentaire vont s'apparier pour former une molécule d'ADN double brin fluorescente (Figure S. 11), (3) Lecture et analyse des données: Chaque « spot » sur la lame de verre est excité par un laser et la fluorescence émise est récupérée via un photo-multiplicateur couplé à un microscope confocal (Figure S. 12). Les différentes analyses effectuées à partir des images de la puce, permettent d'accéder à des informations binaires (présence-absence) mais également d'estimer, en fonction de la quantité de signal, le nombre de molécules d'ADN au départ. L'ensemble des données acquises sur plusieurs expériences peut également être regroupé en fonction des profils d'expression (représenté sous forme de clustering hiérarchique, Figure S. 13)

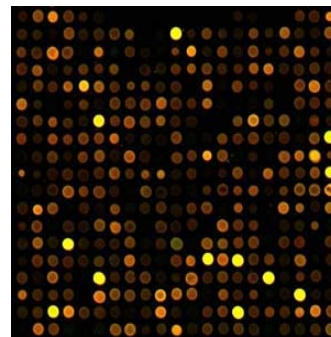


Figure S. 12 : Image d'une biopuce

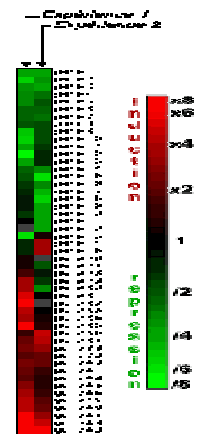


Figure S. 13 : Regroupement des profils d'expression en clustering hiérarchique

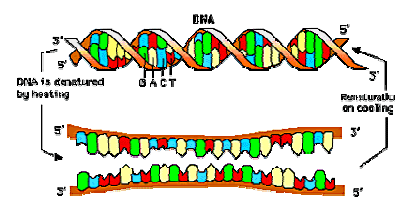


Figure S. 11: Dénaturation, renaturation des brins d'ADN

méthode : la transcription de l'ADN en ARNm^{***} ne conduit pas systématiquement à l'expression d'une protéine fonctionnelle et les transferts horizontaux de gènes codant pour des protéines fonctionnelles sont fréquents chez les procaryotes et complexifient l'affiliation phylogénétique des différentes séquences.

III. D. Les biopuces ADN ou *Microarrays*

Les technologies "*microarrays*" permettent l'analyse de l'expression des gènes, de la variation des séquences ADN, ainsi que l'analyse au niveau protéique, cellulaire ou tissulaire (Stears *et al.* 2003). Ces méthodologies sont fondées sur les principes classiques de la biologie moléculaire avec comme principaux avantages de réaliser des analyses à haut débit avec une précision accrue en comparaison des méthodes standard d'hybridation sur filtres ou sur membranes (Schena *et al.* 1995, DeRisi *et al.* 1996). Ces technologies utilisent de faibles volumes réactionnels, des marqueurs fluorescents présentant des longueurs d'ondes d'absorption différentes, des instrumentations à haut débit pour la construction et la détection, et des outils bioinformatiques sophistiqués pour l'analyse des résultats (Figure S.10-S.13). La vulgarisation des biopuces va sans nul doute conduire à une extension des connaissances dans le domaine des relations phylogénétiques entre les organismes grâce à l'analyse à l'échelle du génome (Sniegowski 1999, Bjorkholm *et al.* 2001). D'autre part, elles permettront d'analyser, à haut débit la composition spécifique des communautés microbiennes dans leurs environnements naturels. L'évolution de ces technologies vers le champ de la protéomique (McBeath et Schreiber 2000, Eickhoff *et al.* 2002) suggère qu'un large spectre de processus biochimiques pourra être étudié par cette voie.

III.E. Métagénomique, ou Génomique environnementale, ou Génomique des populations.

La génomique microbienne a été, jusqu'à très récemment, confinée à des souches individualisées et isolées. Les informations fournies à partir d'isolats issus de divers phyla ont eu un impact considérable sur notre compréhension de la physiologie microbienne, de la biochimie, de l'écologie et de l'évolution. Cependant, cette approche reste limitée en raison de la difficulté de cultiver les microorganismes. En conséquence, de nombreuses questions sur le rôle d'organismes non caractérisés dans les écosystèmes naturels restent en suspens. Parmi les méthodes émergentes développées pour accéder aux données génétiques et physiologiques des microorganismes, la

*** ARNm :ARN messenger

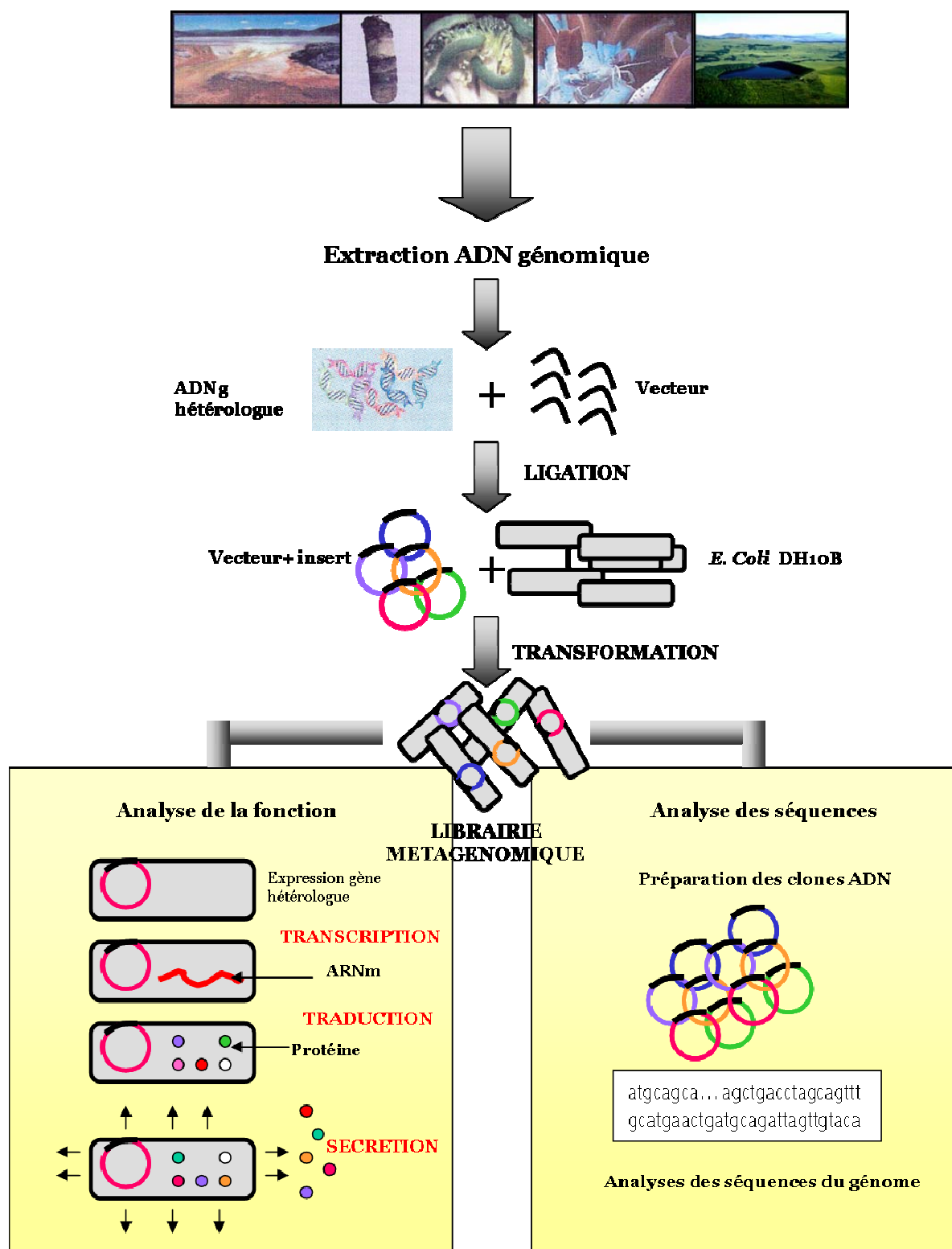


Figure S. 14 : Schématisation des étapes de construction et d'analyse des bibliothèques métagénomiques à partir d'échantillons naturels d'après Handelsman 2004.

métagénomique ou l'analyse du génome d'une population de microorganismes, s'est imposée comme une pièce maîtresse dans les études environnementales (**Handelsman 2004**). L'analyse des génomes microbiens directement à partir de l'environnement a été motivée par plusieurs objectifs qui incluent l'inventaire des différents gènes et la découverte de nouveaux produits microbiens (**Handelsman, 2004, Cowan et al. 2004**). La métagénomique correspond à l'analyse d'une collection d'items similaires mais non identiques, par analogie avec la méta-analyse (ou analyse des analyses, **Glass 1976**). Le concept du clonage direct de l'ADN à partir des échantillons environnementaux a été initialement proposé par **Pace et ses collaborateurs (1985)**, et en 1991 le premier clonage utilisant un vecteur phagique (cosmide^{†††}) a été réalisé (**Schmidt et al. 1991**). Ces analyses impliquent l'isolement de l'ADN à partir d'échantillons naturels, le clonage de l'ADN dans un vecteur approprié, la transformation de ces clones dans une bactérie hôte et l'analyse des transformants résultants (**Figure S. 14**). Les différents clones peuvent être triés sur la base de marqueurs phylogénétiques (ou anchors) comme l'ARNr16S ou d'autres gènes conservés par hybridation ou PCR multiplex^{‡‡} (**Stein et al. 1996**), mais également sur l'expression de traits phénotypiques spécifiques comme certaines activités enzymatiques ou la production d'antibiotiques (**Courtois et al. 2003, Diaz-Torres et al. 2003, Lorenz et al. 2002, Schloss et Handelsman et al. 2003**). Ces approches ont permis d'enrichir notre connaissance du "monde des bactéries non cultivées", et de donner une signification écologique à certains groupes procaryotiques (comme les *Crenarchaeota* (**Schleper et al. 2005**), cf. partie II de la revue bibliographique).

III. F. Cultiver l'"incultivable" : les nouvelles approches.

Les connaissances des fonctions des microorganismes dans l'environnement dérivent, en grande partie, de l'observation de cultures axéniques en laboratoire. Ces transformations bien que réalisées en culture pure, dans des conditions "idéales", permettent d'apporter des informations clés sur le rôle de ces microorganismes dans les cycles biogéochimiques. Ainsi, cultiver des microorganismes, particulièrement ceux appartenant à de nouveaux taxa, apparaît comme une exigence indispensable pour la description de leur biodiversité (**Palleroni 1997**). En effet, la versatilité (et donc la diversité biologique globale) des bactéries et des *Archaea* réside dans leurs propriétés spécifiques qui ne peuvent être observées que sur des organismes vivants.

Le terme de "*great plate count anomaly*" a été introduit par **Staley et Konopka (1985)** pour décrire la différence d'ordre de magnitude entre le nombre de cellules des environnements naturels

^{†††} Cosmide : vecteur de clonage artificiel contenant le gène COS du phage Lambda, pouvant contenir des fragments d'ADN de taille maximale 45 Kb.

^{‡‡} PCR multiplex : amplification de plus d'un amplicon à la fois généralement en ajoutant un couple d'amorce par type désiré.

ayant la capacité à former des colonies sur milieux gélosés et le nombre de bactéries déterminées par comptages microscopiques (Jannash et Jones 1959). Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer cette anomalie : dommages cellulaires résultants d'un stress oxydatif, hyper eutrophie du milieu de culture, induction de phases lysogéniques durant la période de carence, absence des signaux impliqués dans la communication cellulaire, *etc.* (Bruns *et al.* 2002). En définitive, l'absence de croissance des microorganismes dans les conditions de laboratoire peut être attribuée à une connaissance insuffisante de la chimie de leur milieu naturel, et donc à l'incapacité de récréer les conditions adéquates pour leur viabilité et leur croissance. D'autre part les temps de croissance *in-vitro* des microorganismes sont en général difficilement conciliables avec l'impatience du scientifique mais n'impliquent pas que ces microbes soient réfractaires à la culture. La très grande majorité des microorganismes, malgré leurs caractères ubiquistes et cosmopolites, nécessitent le développement de conditions de culture très particulières (Baxter et Sieburth 1984, Button *et al.* 1998, Debruyne *et al.* 1990, Ferris *et al.* 1996, Nold *et al.* 1996, Schut *et al.* 1997). En dépit de l'aspect laborieux que revêt l'adaptation de conditions de croissance spécifiques, un certain nombre d'obstacles ont été franchis depuis les années 1970, par exemple, l'isolement de bactéries hyperthermophiles et de *Crenarchaeota* (Stetter 1999), l'isolement et la caractérisation du rôle prépondérant des bactéries dans les cycles du fer et d'autres métaux (Pennisi 2002), la découverte de la physiologie de bactéries réalisant des processus de déhalogénéation (Mohn et Tiedje 1992), ou encore le séquençage du premier génome archéen (Bult *et al.* 1996).

III.F.1. Isolement de nouveaux "physiotypes".

La connaissance des donneurs et des accepteurs d'électrons potentiellement utilisés par les microorganismes dans leurs processus bioénergétiques est constamment renforcée, et révèle l'existence de voies métaboliques insoupçonnées. Le développement de conditions de culture utilisant des combinaisons de substrats "non-traditionnels" est une voie d'exploration prometteuse pour l'isolement de nouveaux microorganismes. De nombreux exemples pourraient ainsi être évoqués, comme la mise en évidence de bactéries autotrophes aérobies et anaérobies, utilisant l'arséniate comme donneur d'électrons (Santini *et al.* 2000, Oremland *et al.* 2002); la description de nouveaux genres de *β -proteobacteria* intégrant le perchlorate dans leurs processus respiratoires (Achenbach *et al.* 2001); l'isolement de nouvelles souches dénitrifiantes affiliées aux α -, β -, γ -, δ -*Proteobacteria* obtenues à partir d'enrichissements contenant des substances humiques (AHDS^{§§§}) comme donneurs d'électrons (Coates *et al.* 2002) et la mise en évidence *in-vitro* de la capacité de

§§§ AHDS= anthrahydroquinone disulfonate

certaines de ces souches (*Dechloromonas*) à dégrader le benzène en anaérobie (Coates *et al.* 2001), (Tableau S. 3).

Réactions catalysées par des microorganismes récemment mises en évidence		
		Références
$4 \text{ Fe(II)} + \text{O}_2 + 4 \text{ H}^+ \longrightarrow$	$4 \text{ Fe(III)} + 2\text{H}_2\text{O}$	Neubauer <i>et al.</i> 2002
$2 \text{ H}_3\text{AsO}_3 \text{ (Arsenite)} + \text{O}_2 \longrightarrow$	$\text{HAsO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{AsO}_4^- + 3 \text{ H}^+$	Santini <i>et al.</i> 2000
$\text{H}_2\text{AsO}_3^- + \text{NO}_3^- \longrightarrow$	$\text{H}_2\text{AsO}_4^- + \text{NO}_2^-$	Oremland <i>et al.</i> 2002
$4 \text{ HPO}_3^{2-} \text{ (Phosphite)} + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \longrightarrow$	$4\text{HPO}_3^{2-} + \text{HS}^-$	Schink et Friedrich 2000a
$4 \text{ HPO}_3^{2-} + 2 \text{ CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow$	$4 \text{ HPO}_4^{2-} + \text{Acetate} + \text{H}^+$	Schink <i>et al.</i> 2002
$5 \text{ AHDS}^{2-} + 2\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow$	$5 \text{ AQDS}^{2-} + \text{N}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$	Coates <i>et al.</i> 2002
$\text{Benzene} + 6 \text{ NO}_3^- + 6 \text{ H}^+ \longrightarrow$	$6\text{CO}_2 + 3 \text{ N}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$	Coates <i>et al.</i> 2001

Tableau S. 3 : Exemple de processus bioénergétiques récemment mis en évidence (d'après Leadbetter 2003)

III.F.2.Cultiver des représentants de nouveaux taxa.

✦ LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DE CELLULES INDIVIDUELLES : L'unique façon de garantir la pureté d'une culture microbienne est de s'assurer qu'elle dérive d'une cellule unique. Les techniques traditionnelles d'isolement ne peuvent certifier qu'une culture provient de la division d'une seule cellule. Deux techniques ont été récemment développées afin de permettre l'isolement de cellules individuelles :

Les pinces optiques sont constituées d'un microscope inversé contrôlé par ordinateur et équipé d'un laser infra-rouge néodymium émettant à 1064 nm. Une cellule peut être immobilisée grâce au faisceau laser, isolée du mélange cellulaire en déplaçant la platine du microscope, et transférée dans un milieu de culture (Frohlich et König 2000, Huber *et al.* 2000a). Cette technique a permis d'isoler avec succès des bactéries et des *Archaea* hyperthermophiles (Aschkin *et al.* 1987, Huber *et al.* 2000b).

Les micromanipulateurs (Frohlich et König 2000), constitués d'un microscope inversé, ces systèmes sont munis de capillaires stériles, qui vont servir au prélèvement, et dont le diamètre d'ouverture peut être ajusté à la taille de la bactérie d'intérêt. Ces capillaires peuvent être positionnés rapidement et précisément grâce à un système pneumatique ou hydraulique. Le capillaire, placé au dessus de la cellule d'intérêt, déverse une goutte de solution stérile pour la mettre en suspension et l'aspirer. En outre, il existe des enceintes à atmosphère contrôlée ("COY chamber"), adaptées à ce type d'équipement, qui permettent l'isolement de micro-organismes anaérobies.

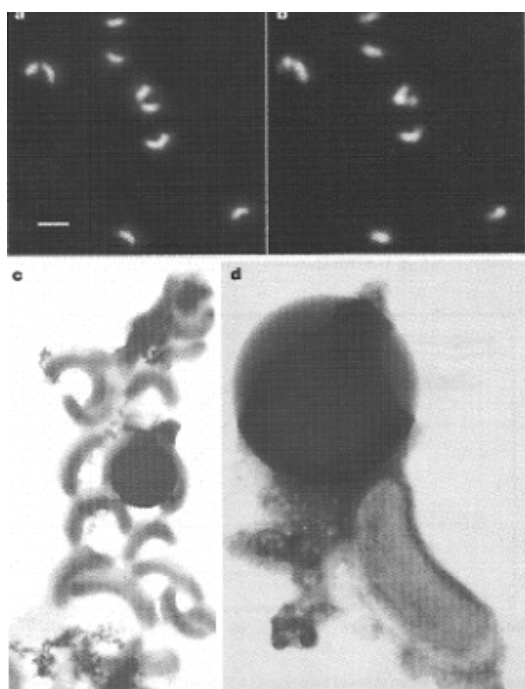


Figure S. 15: Photographies des isolats SAR11.
a et b : microscopie en épifluorescence.
c et d : microscopie électronique à transmission.
(Rappé *et al.* 2002)

Ces cellules en forme de vibron sont de taille extrêmement réduite ($0,37\text{-}0,89\ \mu\text{m}$ de long ; $0,12\text{-}0,2\ \mu\text{m}$ de diamètre) et présentent moins de 82% de similarité avec des α -protéobactéries cultivées. Les densités maximales obtenues en culture oscillent entre 3.10^5 et $3.10^6\ \text{cell.ml}^{-1}$, suggérant que des facteurs naturels présent dans l'eau de mer (base des milieux de culture) contrôlent les populations SAR11 en culture (Rappé *et al.* 2002). Ces observations sont d'un intérêt océanographique particulier, en effet, les souches SAR11 cultivées peuvent être utilisées pour identifier les facteurs chimiques susceptibles de contrôler leurs abondances dans les environnements naturels.

Ces souches fournissent une opportunité particulière de séquençage du génome d'un organisme manipulable en culture pure et présentant une signification biogéochimique. D'autre part, la taille très réduite de ces isolats permettra d'affiner la compréhension de la machinerie macromoléculaire minimale requise pour une réplication cellulaire autonome.

■ **METHODES DE DILUTION ET D'ENCAPSULATION :** **Button *et al.* (1993)**, pionniers des approches ayant permis l'isolement de nouveaux groupes bactériens issus d'environnements marins oligotrophes, ont développé une méthodologie culturale dénommée "*extinction culturing*". De l'eau de mer non amendée est utilisée comme milieu de culture, et les communautés naturelles de microorganismes sont diluées jusqu'à un nombre connu de cellules (entre 1 et 10 cellules par tube). La croissance potentielle de ces cellules en culture est analysée par cytométrie en flux. Cette méthode permet d'obtenir des isolats sans passage sur milieu gélosé et élimine donc le biais de la capacité des cellules à former des colonies. Cette approche a notamment permis de décrire deux nouvelles espèces hétérotrophes du bacterioplancton : *Sphingomonas alakensis* et *Cycloclasticus oligotrophus* (**Vancanneyt 2001**). Un exemple intéressant d'utilisation et de perfectionnement de cette méthode a été appliqué par Giovannoni et ses collaborateurs sur le groupe des bactéries SAR11. Ces dernières appartiennent à la sub-division *α-Proteobacteria*, et ont été identifiées dans les environnements naturels par des approches PCR-dépendantes (**Giovannoni *et al.* 1990**). Initialement détectées dans la mer des Sargasses, où elles représentaient 15% de l'ARN bactérien, les cellules SAR11 ont également été mises en évidence dans des eaux côtières des Bermudes et de Key Biscayne (Floride). Plus récemment, **Field *et al.* 1997** ont révélé l'existence de deux sous-groupes SAR11 exhibant des distributions spatiales spécifiques dans les océans Atlantique et Pacifique. Ainsi les cellules du groupe SAR11, ubiquitaires et abondantes (jusqu'à 50% de l'ADNr16S des eaux océaniques, **Morris *et al.* 2002**), sont restées sans représentant cultivé durant de nombreuses années et aucune fonction ne pouvait être attribuée à ce groupe. Le développement de la méthode "*High-Throughput Culturing*" (HTC, ou culture à haut-débit) (**Connon et Giovannoni 2002**) a permis d'isoler plusieurs nouvelles souches microbiennes dont des membres de clades n'ayant pas de représentant cultivé. Ainsi, 11 isolats membres du clade SAR11 ont pu être cultivés et cryopréservés (**Rappé *et al.* 2002**), l'espèce représentante a été dénommée "*Pelagibacter ubique*" (**Figure S. 15**).

Consécutivement à la méthode HTC, une technique de culture révolutionnaire a été mise au point dans l'industrie des biotechnologies (**Zengler *et al.* 2002**), cette approche couple l'encapsulation de cellules isolées en gel microgouttes (GMD), et l'analyse de la formation de microcolonies intra-GMD par cytométrie en flux. La culture GMD est réalisée en continu (chémostat), alimentée par un flux constant de milieu oligotrophe, les cellules encapsulées individuellement sont ainsi cultivées dans le même réacteur. Cette proximité permet l'échange de métabolites et de molécules signal grâce à une porosité suffisamment large de la matrice GMD. Après des périodes d'incubation relativement longues, les GMD contenant des microcolonies sont séparées par cytométrie en flux et placées dans un milieu de croissance (**Figure S. 15 et S. 16**)

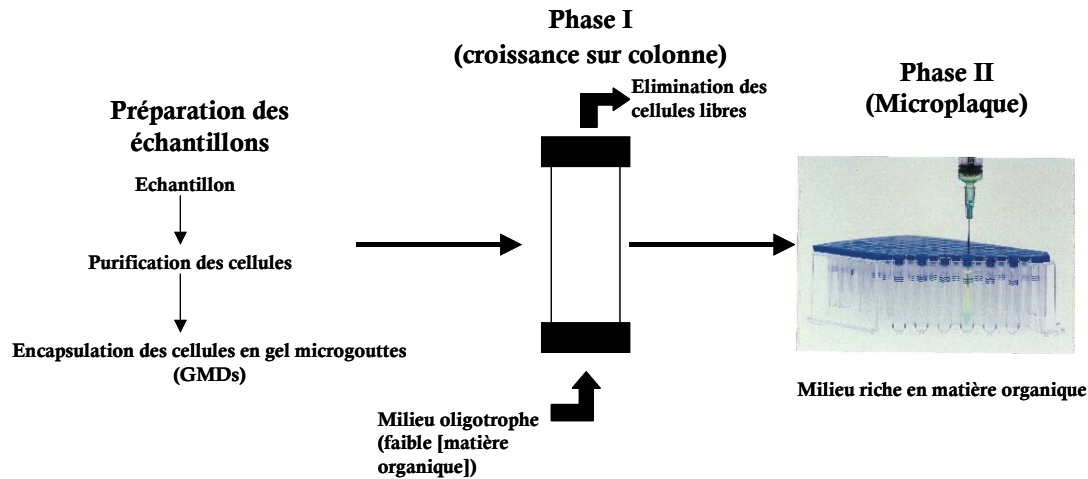


Figure S. 15 : Schéma du protocole expérimental d'encapsulation : les cellules de l'environnement sont encapsulées dans les GMDs et incubées dans des colonne de croissance (Phase I). Secondairement les GMDs contenant des micro colonies sont détectées et séparées par cytométrie en flux dans 96 puits de microplaque contenant un milieu riche en MO (Phase II). D'après Zengler *et al.* 2002.

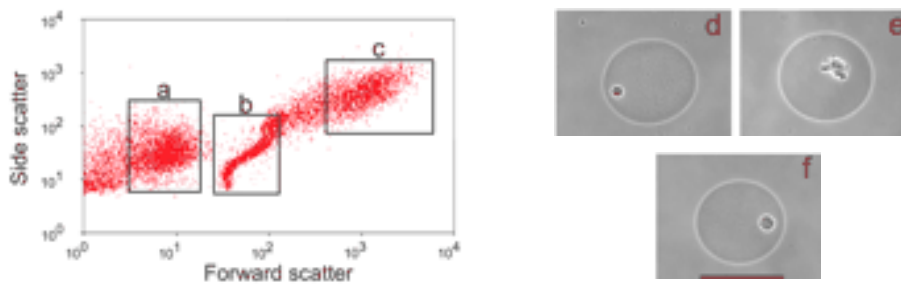


Figure S. 16 : Discrimination par cytométrie en flux entre (a) les cellules libres, (b) les GMDs vides ou occupées par une seule cellule, et (c), les GMDs contenant des microcolonies. d à f : microphotographies en contraste de phase des GMDs séparées contenant des microcolonies. D'après Zengler *et al.* 2002.

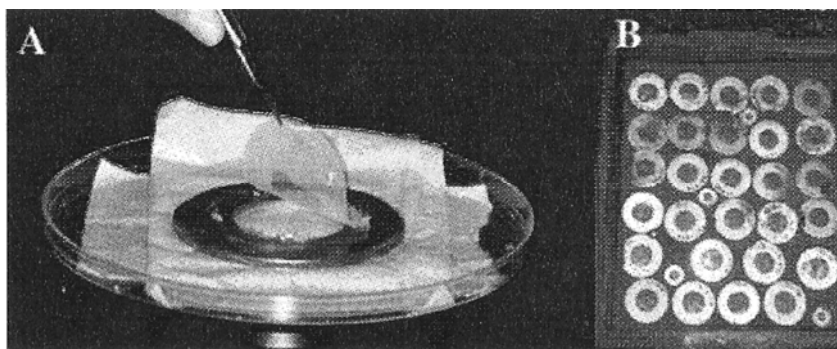


Figure S. 17: Chambre de diffusion pour la culture *in situ* des microorganismes environnementaux. (A) la chambre est constituée de 2 filtres en polycarbonate (0,03µm de porosité) entre lesquels sont cultivés les bactéries (« en sandwich »). (B) La croissance des bactéries se réalise par incubation des chambres à la surface de sédiment marin. D'après Kaerberlein *et al.* 2002.

Les méthodes HTC ou d'encapsulation en GMD soulignent l'importance de cultiver les microorganismes dans un environnement chimique le plus proche possible de l'environnement naturel. La technique GMD confère également un rôle primordial aux processus de communication cellulaire. Dans ce cadre, **Kaeberlein et ses collaborateurs (2002)**, ont développé une méthodologie particulière de culture, à partir d'échantillons de sédiment intertidal. Les microorganismes séparés des particules sédimentaires sont placés dans des chambres de diffusion incubées dans un "aquarium" contenant de l'eau de mer (Figure S. 17). La membrane de diffusion permet les échanges avec l'environnement en limitant les mouvements cellulaires. Cette stratégie de culture simulant l'habitat naturel a permis l'isolement de deux nouvelles souches MSC1 et MSC2, non décrites, affiliées aux *Sphingobacteria*. Ces auteurs postulent "*microorganisms use pheromones to communicate both within and across species. It seems possible that microorganisms require specific signals originating from their neighbors that indicate the presence of a familiar environment. Implicit in this signaling hypothesis is that microorganisms will not grow in an unfamiliar environment even in the presence of appropriate nutrients*".

Ces nouvelles stratégies, qui ont permis d'accéder à l'isolement de nouveaux taxons bactériens, permettront une investigation plus complète des communautés microbiennes et notamment des interactions inter- ou intra-spécifiques (encapsulation multiple, incubation *in-situ* des GMD, **Zengler et al. 2002**). Les nouvelles approches culturelles s'orientent ainsi vers le développement de milieux oligotrophes, simulant l'habitat naturel, et privilégient les échanges de métabolites ou de signaux cellulaires entre microorganismes. Ces échanges apparaissent comme un facteur primordial conditionnant la croissance des microorganismes en culture. **Bruns et al. (2002)** ont ainsi étudié l'influence de l'AMP cyclique (impliqué dans la régulation de l'expression des gènes durant en période de carence) et de deux différentes N-acyl homosérines lactones (molécule signal utilisée par les Gram-négatives dans le processus de *Quorum Sensing*) sur l'efficacité de culture de communautés bactériennes issues de la Mer Baltique. Cette stratégie a permis l'isolement de deux nouvelles souches G100 et G200, affiliées à la famille des *Rhodobacteriaceae* de la subdivision *α-Proteobacteria*.

Catégorie de taille	Groupe microbien	Gamme de taille (µm)
Fentoplancton	Virus	0.01-0.2
	Prokaryotes	
Picoplancton	Eubacteria	
	Photoautotrophes	0.5-1.0
	Prochlorophytes	0.5-2.0
	Cyanobactéries cocoides	1.0-2.0
	Cyanobactéries filamenteuses	7-10 (large), <100 (long)
	Chemoautotrophes	0.3-10
	Hétérotrophes	0.3-10
	Archaea	
Nanoplancton	Eukaryotes	1.0-2.0
	Picoalgues, Picoflagellés hétérotrophes	2.0-20
Microplancton	Nanoalgues, Nanoflagellés hétérotrophes	2.0-20
	Microalgues	
	Protistes hétérotrophes (ciliés et dinoflagellés)	20-200

Tableau S. 4: Principaux groupes de microorganismes pélagiques. Les catégories de taille sont définies sur la base du biovolume d'après Sieburth *et al.* 1978.

Environment	N°. of prokaryotic cells ($\times 10^{28}$)	g of C ($\times 10^{15}$)
Aquatic habitats	12	2.2
Oceanic subsurface	355	303
Soil	26	26
Terrestrial subsurface	25-250	22-215
Total	415-640	353-546

Tableau S. 5 : Estimation de l'abondance et de la biomasse des procaryotes dans le monde (d'après Rosselló-Mora et Amann 2001).

II^{ème} PARTIE: LES PROCARYOTES DANS L'ENVIRONNEMENT

Dans les environnements naturels, l'hétérogénéité du monde microbien est visible par la différence de taille entre les plus petites cellules bactériennes (environ 0,3µm) et les ciliés brouteurs (environ 150 µm) qui est équivalente à celle entre le krill (4 cm) et une baleine (20 m), (Tableau S. 4). Au sein du monde microbien, les *Archaea* et les *Eubacteria* sont les organismes les plus abondants de la biosphère (Tableau S. 5) et leur impact écologique leur confère une position primordiale au sein des écosystèmes. Leurs capacités à croître et à se reproduire rapidement suggèrent que ces organismes peuvent s'adapter rapidement aux changements ou aux stimuli environnementaux et leur caractère ubiquiste distinguent les bactéries de l'environnement des microorganismes cultivés en laboratoire.

I- Les ARCHAEA

I. A. Historique du "Troisième monde" : de Woese aux années 2000

I.A.1. Formes ancestrales ou évolution secondaire ?

Woese et ses collaborateurs (1990) ont proposé une classification du monde vivant en trois domaines, ainsi que le terme *Archaea*, suggérant une origine ancestrale, pour la dénomination du second domaine procaryotique. Ces auteurs ont également postulé que les *Archaea* constituent un domaine aussi distinct des eubactéries que des eucaryotes en se basant sur deux hypothèses : les *Eubacteria* et les *Archaea* dérivent indépendamment du progénote (hypothétique ancêtre commun, **Woese 1998a**), et sur un plan moléculaire, les *Archaea* sont aussi proches des eucaryotes que des eubactéries (**Woese et al. 1990**). Ces travaux, qui ont drastiquement modifié la vision du monde vivant, ont néanmoins été soumis à controverse (**Mayr 1998**). Si la division du monde vivant en trois grands domaines ne semble plus devoir être actuellement remise en question, l'origine des *Archaea* reste cependant un sujet de discussion d'intérêt pour nombre de biologistes évolutifs. Le séquençage complet du génome de deux *Archaea* (*Methanococcus jannaschii* et *Methanobacterium thermoautotrophicum*) a permis de déterminer les similarités existant entre les génomes des *Archaea*, des *Eubacteria* et des *Eukarya*. Les travaux de **Koonin et al. (1997)** et de **Smith et al. (1997)** ont ainsi révélé que 77% des gènes archéens sont plus proches des *Eubacteria* et 23% des *Eukarya* suggérant que les deux domaines procaryotiques sont plus proches entre eux que les *Archaea* ne le sont des *Eucarya*. Les éléments transcriptionnels, traductionnels, et la machinerie de l'épissage des *Archaea* ressemblent à ceux des eucaryotes. Zilling et ses collaborateurs ont notamment mis en évidence que les séquences de l'ADN polymérase ARN

dépendante et le promoteur basal des *Archaea* présentaient d'étroites similarités avec ceux des eucaryotes (**Huet et al. 1983 ; Reiter et al. 1988**). D'autre part, la majorité des gènes codant pour les enzymes métaboliques, les systèmes de transport, et les enzymes de synthèse de la paroi sont plus proches des eubactéries (**Brown et Doolittle, 1997**).

La nature chimérique du génome des *Archaea* comprenant des gènes métaboliques bactériens et des gènes de protéines traductionnelles et transcriptionnelles eucaryotes a conduit les microbiologistes à formuler un certain nombre d'hypothèses pour expliquer cette constitution en mosaïque mais aucune n'apparaît complètement convaincante. **Koonin et al. (1997)** ont suggéré que les *Archaea* seraient issues d'un événement de fusion similaire à celui ayant permis l'émergence des eucaryotes. Si cette hypothèse est exacte, un organisme bactérien serait une des composantes du génotype ancestral de la chimère mais quel serait l'autre ? Aucun organisme connu ne peut, en effet, accréditer ce postulat. **Woese (1998b)** suggère que les *Archaea* pourraient résulter d'un processus précoce d'évolution impliquant des échanges horizontaux de matériel génétique qui excèderaient la transmission verticale à une période d'évolution pré-généalogique. L'origine des *Archaea* constitue donc actuellement un puzzle difficilement solvable, et si certains auteurs comme Carl Woese placent les *Archaea* très précocement dans les processus évolutifs, d'autres suggèrent qu'elles dérivent secondairement d'une lignée d'*Eubacteria*. **Galtier et ses collaborateurs (1999)** ont été amenés à mettre en doute la validité de la conjecture postulant que les *Archaea* thermophiles seraient proches de l'ancêtre universel des organismes vivants. Leurs analyses qui tirent partie d'une relation entre le caractère thermophile et la proportion de GC dans les ARN ribosomiaux suggèrent que le plus récent ancêtre universel vivait vraisemblablement à une température inférieure à 60°C. Cette découverte n'exclut pas une origine de la vie encore plus ancienne, en milieu chaud, mais elle modifie le regard de la communauté scientifique sur les espèces thermophiles actuelles qui apparaissent non plus comme les reliques d'un très lointain passé mais comme l'aboutissement d'une longue évolution.

I.A.2. Evolution des connaissances sur la diversité taxonomique des *Archaea*.

Les premières études basées sur la phylogénie de l'ARNr 16S (**Woese 1987**) d'un petit nombre d'espèces cultivées, distinguaient deux groupes d'*Archaea* : les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota*. Le domaine des *Crenarchaeota* regroupe les hyperthermophiles et les thermoacidophiles (comme les genres *Sulfolobus*, *Desulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Thermoproteus*, *Thermophilum*). Les espèces appartenant au domaine des *Euryarchaeota* présentent des niches écologiques plus variées et incluent : les hyperthermophiles (comme les genres *Pyrococcus* et *Thermococcus*), les méthanogènes (*Methanosarcina*, etc.), les halophiles (*Halobacterium*, *Haloferax*, etc.), et les méthanogènes thermophiles (avec des représentants des genres *Methanothermus*,

Methanobacterium, *Methanococcus*). La cohérence phylogénétique du phylum des *Archaea* était ainsi de manière surprenante en accord avec leurs motifs phénotypiques (thermophiles, halophiles, méthanogènes) et les habitats colonisés (Woese *et al.* 1978). D'autre part, la diversité fonctionnelle de ces organismes, établie sur la base des souches cultivées, apparaissait réduite en comparaison de celle des eubactéries (Woese 1987). Cette image a été considérablement altérée quand les méthodes moléculaires ont été appliquées à l'étude *in situ* des microorganismes. Les amplifications PCR de séquences ARNr de microorganismes issus d'environnements variés ont révélé un grand nombre de nouvelles espèces d'*Archaea* vivant dans des environnements mésophiles.

Les premières séquences d'*Archaea*, non cultivées, ont été obtenues à partir de banques de clones ARNr16S provenant de l'Océan Pacifique (Fuhrman *et al.* 1992). Cette étude a révélé la présence, dans cet environnement, d'*Archaea* mésophiles affiliées au groupe des *Crenarchaeota*, une branche des *Archaea* initialement représentée par les hyperthermophiles. A la même période, DeLong et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de deux nouveaux groupes d'*Archaea* issus des eaux de surface d'écosystèmes côtiers, un groupe appartenant aux *Crenarchaeota*, l'autre aux *Euryarchaeota* (DeLong 1992). Ces deux études ont initié une première remise en question de la faible diversité taxonomique et fonctionnelle des *Archaea*, la distribution de ces dernières apparaissant plus large que celle suggérée par les motifs phénotypiques des *Archaea* cultivées. Suite à ces travaux, une origine allochtone de ces *Archaea* transportées d'un habitat hydrothermal a été supposée, cependant, la découverte d'*Archaea* en densités élevées dans des eaux aérobies de l'Antarctique (-1,8°C) (DeLong *et al.* 1994) et l'association de *Crenarchaeota* avec des éponges marines vivant à 10°C (Preston *et al.* 1996) a fourni des arguments supplémentaires pour suggérer que les *Archaea* rencontrées dans les environnements marins mésophiles étaient natives de ces biotopes. A partir de ces premières études, la recherche des *Archaea* s'est étendue à de multiples habitats : les écosystèmes marins (Fuhrman et Davis 1997, Massana *et al.* 1997, McInerney *et al.* 1997 ; Murray *et al.* 1998, Stein *et al.* 1996); les écosystèmes terrestres forestiers et agricoles (Bintrim *et al.* 1997, Borneman et Triplett 1997, Jurgens *et al.* 1997); les écosystèmes aquatiques continentaux (McGregor *et al.* 1997, Ovreas *et al.* 1997, Schleper *et al.* 1997) ; les digesteurs anaérobies (Godon *et al.* 1997) ; et les associations avec les métazoaires (Van der Maarel *et al.* 1998). L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence trois nouveaux groupes d'*Archaea* non cultivées au sein des deux phyla initiaux (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*) : Le groupe I est affilié aux *Crenarchaeota* et comprend des espèces issues des environnements marins et terrestres.

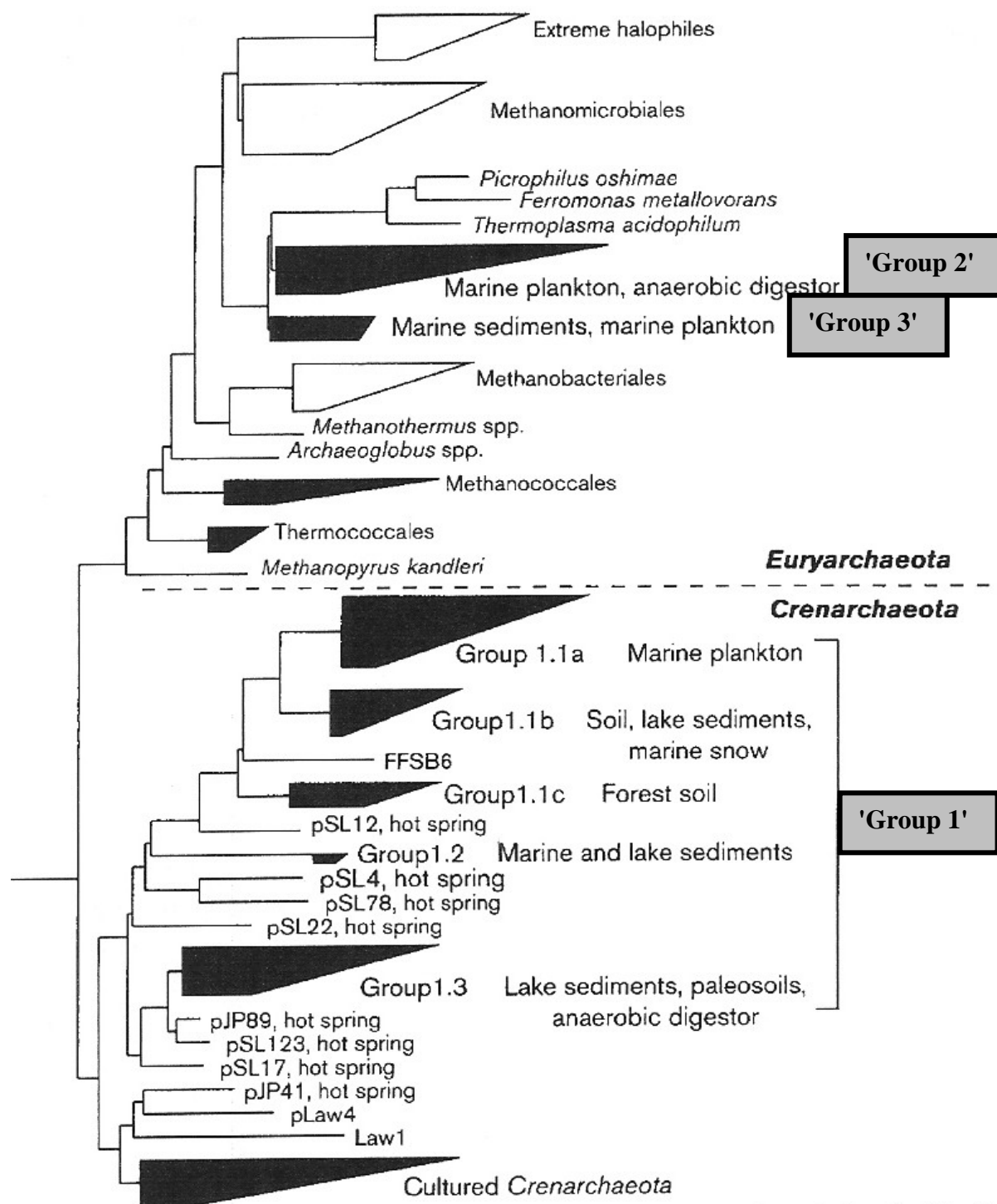


Figure S. 18: Positions phylogénétiques de trois nouveaux groupes d'*Archaea* non cultivées, sur la base de l'analyse des séquences 16S rDNA. PJP et pSL représentent des séquences obtenues à partir d'une source hydrothermale du Yellowstone National Park (Schleper et *al.* 1995), d'après DeLong. 1998.

Les groupes II et III sont affiliés aux *Euryarchaeota* (**Figure S. 18**). En 1998, DeLong publie une revue de synthèse ("*Everything in moderation : Archaea as non-extremophiles*") retraçant l'évolution de la vision des *Archaea* et formule à partir des travaux réalisés dans différents écosystèmes, des tendances générales (**Tableau S. 6**):

	Reports of archaeal group within habitat		
	Group I	Group II	Group III
Habitat type			
Marine plankton	+	+	+
Marine fish	+	+	-
Marine sediment	+	-	+
Marine invertebrates	+	-	-
Lake plankton	+	-	-
Lake sediments	+	-	-
Deep paleosol	+	-	-
Forest soil	+	-	-
Agricultural soil	+	-	-
Anaerobic digester	+	+	-

Tableau S. 6: Synthèse de la diversité des *Archaea* non cultivables en fonction de l'habitat. (+=Présent; -=absent), D'après DeLong 1998.

Il apparaît ainsi que :

-Le Groupe I (*Crenarchaeota*) semble le plus largement distribué, le plus abondant et le plus écologiquement diversifié.

-Il existe une cohérence phylogénétique pour les séquences d'*Archaea* du groupe I issues des environnements marins, alors que celles issues des sédiments ou du sol sont affiliées à différents sous-groupes.

- Les Groupes I et II des *Archaea* des environnements marins, apparaissent atteindre leurs abondances maximales à différentes profondeurs de la colonne d'eau. Le groupe I atteint en général des densités maximales sous 100 m de profondeur dans les environnements marins. (Massana *et al.* 1997 ; McInerney *et al.* 1997 ; Murray *et al.* 1998)

- Il existe une plus grande divergence des *Euryarchaeota* du groupe II isolées d'un même biotope que dans toute la sympatrie du groupe I des *Archaea* issues d'environnements marins.

- Des sous ensembles du groupe I apparaissent affiliés à des *Archaea* spécifiques des sources chaudes.

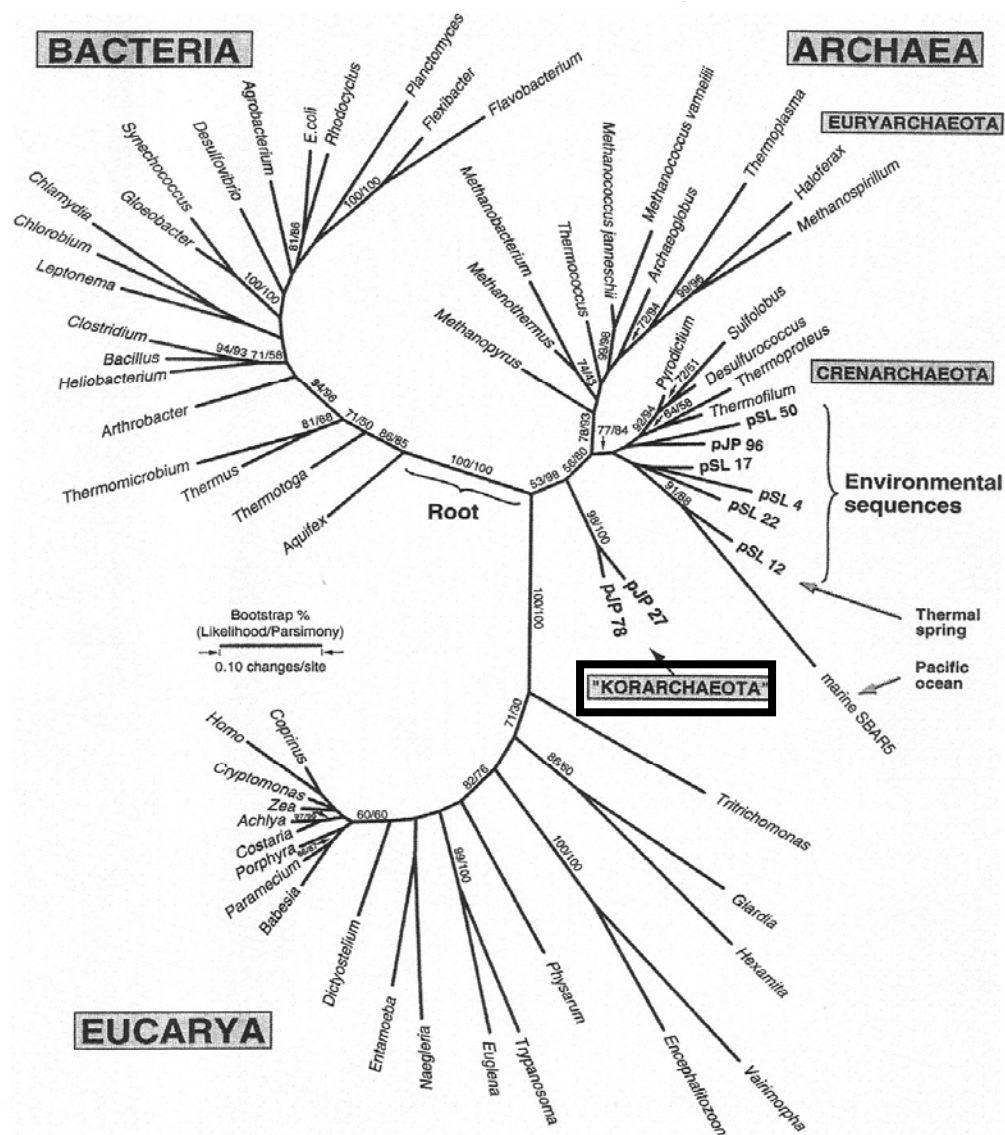


Figure S. 19: Arbre phylogénétique universel, non enraciné indiquant les trois domaines du vivant et la séparation du domaine des *Archaea* en trois groupes (d'après Barns *et al.* 1996).

Cette dernière observation a été confirmée par des analyses séquentielles réalisées sur la microflore de sources chaudes du Yellowstone National Park (Barns *et al.* 1994, 1996). Ces études ont mis en évidence une divergence entre les séquences d'*Archaea* issues de ce biotope avec celles appartenant aux deux phyla archéens initialement identifiés. Ces organismes ont ainsi été affiliés à un troisième phylum : les *Korarchaeota* (Figure S. 19)

I.A.3. Notre connaissance actuelle de la diversité taxonomique des *Archaea*.

En 2002, Huber et ses collaborateurs ont isolé d'une source chaude sous-marine, une nouvelle *Archaea* hyperthermophile: "*Nanoarchaeum equitans*". Cette dernière n'étant pas affiliée aux trois phyla archéens précédents (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* et *Korarchaeota*), ces auteurs ont proposé la constitution d'un nouveau groupe d'*Archaea* : les *Nanoarchaeota* (Figure S. 20).

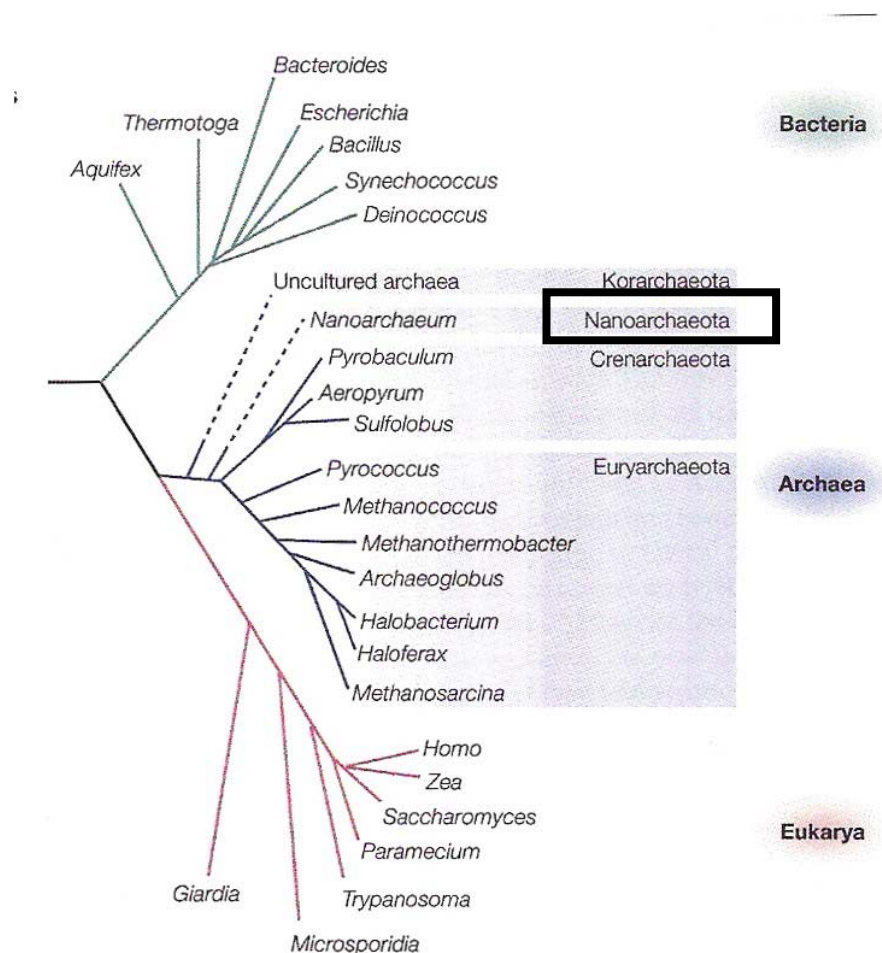


Figure S. 20: Arbre phylogénétique présentant les quatre grands groupes d'*Archaea* (d'après Allers et Mevarech 2005).

Groupe	Caractéristiques générales	Genres représentés
<i>Archaea</i> méthanogènes	Anaérobies strictes. Le métabolite final majeur est le méthane. S° peut être réduit en H ₂ S sans production d'énergie. Les cellules possèdent la coenzyme M, les facteurs 420 et 430.	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanomicrobium</i> <i>Methanosarcina</i>
<i>Archaea</i> réductrices de sulfates	Cellules coccoïdes irrégulières, Gram-négatives. Formation d'H ₂ S à partir de thiosulfate et de sulfate. Croissance autotrophe sur thiosulfate et H ₂ . Peuvent se développer de manière hétérotrophe. Production de traces de méthane. Bactéries thermophiles extrêmes et strictement anaérobies. Les cellules possèdent le facteur 420 et la méthanoptérine mais ni la coenzyme M ni le facteur 430.	<i>Archaeoglobus</i>
<i>Archaea</i> halophiles extrêmes	Bâtonnets coccoïdes ou de formes irrégulières. Cellules Gram-négatives ou Gram-positives, essentiellement anaérobies, chimioorganotrophes. Demandent des concentrations élevées en chlorure sodique pour se développer (>1,5M). Les colonies présentent diverses nuances de rouges. Neutrophiles ou acidophiles. Mésophiles ou légèrement thermophiles. Certaines espèces contiennent la bacteriorhodopsine et utilisent la lumière pour synthétiser l'ATP.	<i>Halobacterium</i> <i>Halococcus</i> <i>Natronobacterium</i>
<i>Archaea</i> sans paroi	Cellules pléomorphes sans paroi cellulaire. Thermoacidophiles et chimioorganotrophes. Aérobie facultatif. La membrane plasmique contient une glycoprotéine riche en mannose et un lipoglycane.	<i>Thermoplasma</i>
Thermophiles extrêmes métabolisant S°	Bacilles Gram-négatifs, filaments ou coques. Thermophiles obligatoires (développement optimum à des températures comprises entre 70 et 105°C). Habituellement anaérobies stricts mais peuvent être aérobie ou aérobie facultatifs. Acidophiles ou neutrophiles, autotrophes ou hétérotrophes, la plupart métabolisent le soufre. Réduisent S° en H ₂ S en anaérobiose, oxydent H ₂ S ou S° en H ₂ SO ₄ en aérobie.	<i>Desulurococcus</i> <i>Pyrodictium</i> <i>Pyrococcus</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Thermococcus</i> <i>Thermoproteus</i>

Tableau S. 7: Caractéristiques des groupes principaux d'*Archaea* cultivées (discriminées sur la base de critères morphologiques et physiologiques).



Figure S. 21: Les habitats typiques des bactéries thermophiles : Sources chaudes du Yellow Stone national parc (USA), photos Charles Lemarchand 2005.

Le dépôt de plus de 8000 séquences d'*Archaea* dans les banques de données, a contribué à accroître le nombre de groupes connus et à étendre le nombre de phyla (**Schleper et al. 2005**). Ainsi, En **2002**, **Hugenholtz** détermine, en se basant sur l'analyse comparative des séquences ARNr16S, 18 différents groupes pour le domaine des *Archaea* (dont 10 ne contiennent pas d'*Archaea* cultivées). Certains de ces groupes semblent, comme l'avait supposé **DeLong (1998)** inféodés à des locations géographiques précises, alors que d'autres apparaissent plus largement distribués. Par exemple dans les deux lignées des *Crenarchaeota*, qui sont souvent définies comme regroupant des séquences du plancton marin (Groupe I.1A) et des séquences du sol (Groupe I.1B), sont également affiliées des séquences issus d'écosystèmes aquatiques continentaux et d'environnements profonds (**Ochsenreiter et al. 2003**, **Takai et al. 2001**). Il apparaît surprenant que la grande majorité des nouvelles séquences découvertes soient affiliées aux deux principaux phyla, les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota*, qui ont été définis en 1986 sur la base d'un petit nombre d'organismes cultivés (**Woese et Olsen 1986**). Cependant, le positionnement de nouvelles lignées plus enracinées (Figure S. 24) révélées par des approches moléculaires globales (*Korarchaeota*, AAG (ancient archaeal group), **Barns et al. 1996**, **Takai et Horikoshi 1999**) ou par des approches culturelles (*Nanoarchaeota*, **Huber et al. 2002**) suggère que de nouvelles lignées pourraient encore être découvertes par des approches d'écologie moléculaire, des techniques culturelles plus sophistiquées et par des approches de métagénomique (**Schleper et al. 2005**).

La large distribution et l'abondance des *Archaea* dans les écosystèmes aquatiques et terrestres suggèrent qu'elles contribuent significativement aux cycles énergétiques globaux. Cependant la grande majorité de ces organismes a été uniquement mis en évidence dans les écosystèmes par des approches PCR-dépendantes et aucun organisme représentatif des nouveaux groupes détectés n'a été cultivé en laboratoire et leurs métabolismes spécifiques restent inexplorés.

I. B. Diversité métabolique des *Archaea*

I.B.1. Métabolismes identifiés à partir de souches cultivées.

De part la variété de leurs modes de vie (Tableau S. 7), le métabolisme des *Archaea* est très différent selon les groupes et s'étend de l'organotrophie à l'autotrophie, certaines peuvent même réaliser une forme inhabituelle de photosynthèse.

■ EXEMPLES DE METABOLISMES CHEZ LES CRENARCHAEOTA : La plupart des *Crenarchaeota* isolées en culture sont des thermophiles ou des acidophiles dépendantes du soufre.

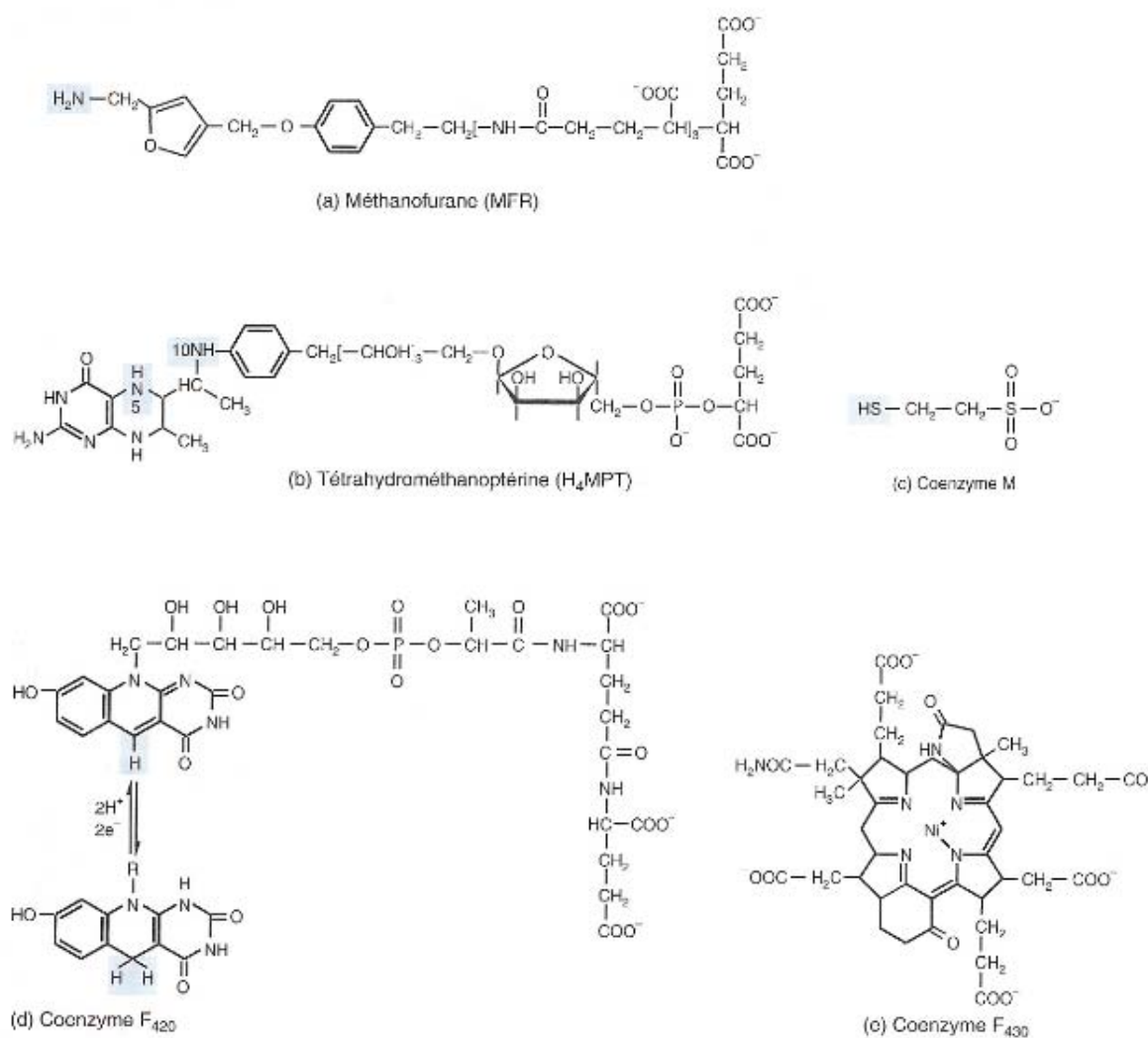


Figure S. 22: Les coenzymes de méthanogènes. Le MFR, H₄MPT, coenzyme M transportent les unités à un carbone au cours de la méthanogénèse (MFR et MPT participent aussi à la synthèse de l'acétyl-CoA). La coenzyme F₄₃₀ est une coenzyme de la méthyl-CoM méthyltransférase.

Le soufre peut être utilisé soit comme un accepteur d'électrons dans une respiration anaérobie, soit comme une source d'électrons par des lithotrophes.

Exemple : Le genre *Pyrodictium*, appartenant aux *Desulfurococcaceae*, isolé de sources marines géothermales se développe à une température optimale de 105°C. Ce groupe contient des organotrophes* et des lithotrophes†, les sources d'électrons les plus communes pour ces dernières sont le soufre et l'H₂.

Exemple 2 : *Sulfolobus* (Sulfolobales) est un groupe de thermoacidophile se développant à un optimum de température entre 70 et 80°C et à un pH compris entre 2 et 3. Ces *Archaea* sont des lithotrophes se développant sur des granules de soufre en l'oxydant en acide sulfurique. L'O₂ est l'accepteur classique d'électrons mais le fer ferrique peut être utilisé. Certains oses et acides aminés comme le glutamate peuvent aussi être utilisés comme sources de carbone et d'énergie.

Exemple 3 : *Thermoproteus* (Thermoproteales), anaérobie stricte se développant à des températures extrêmes (de 70 à 96°C) et des valeurs de pH comprises entre 2,5 et 6,5. Cette *Archaea* peut se développer en organotrophie et oxyder le glucose, des acides aminés, des alcools et des acides organiques en utilisant le soufre élémentaire comme accepteur final d'électrons. Elle présente également la capacité de chimiolitotrophie‡ en utilisant H₂ et S°, dans ce cas le CO₂ et le CO sont les sources uniques de carbone.

■ EXEMPLES DE METABOLISME CHEZ LES EURYARCHAEOTA :

-Les Méthanogènes : constituent le groupe le plus vaste des *Euryarchaeota* et comprennent 5 ordres (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales*). Ces *Archaea* anaérobies strictes obtiennent de l'énergie en convertissant le CO₂, le formiate, le méthanol, l'acétate, et d'autres substances en méthane ou en méthane et CO₂. Leurs capacités à produire du méthane suggèrent l'existence de voies métaboliques très particulières. Ces procaryotes contiennent, en effet, plusieurs cofacteurs spécifiques : la tétrahydrométhanoptérine (H₄MPT), le méthanofurane (MFR), la coenzyme M (acide 2-mercaptoéthanesulfonique), les coenzymes F₄₂₀ et F₄₃₀ (Figure S. 22). Les méthanogènes prospèrent dans les environnements anaérobies riches en matières organiques (rumen, sédiments marins ou lacustres, marais, sources chaudes...). L'impact écologique de ce groupe métabolique est primordial et nous reviendrons sur la signification écologique des *Archaea* méthanogènes et sur leurs rôles au sein des réseaux trophiques procaryotiques anaérobies dans le chapitre suivant.

* Organotrophe : utilise des molécules organiques comme source d'électrons

† Lithotrophe : utilise des molécules inorganiques comme source d'électrons

‡ Chimiotrophes : énergie issue de l'oxydation de composés organiques ou inorganiques

-Les Halobactéries constituent un des principaux groupes d'*Archaea*, et ont la particularité de se développer à des concentrations salines optimales de 17 à 23% de NaCl. Ces chimiohétérotrophes aérobies présentent un métabolisme respiratoire exigeant des éléments nutritifs complexes, généralement des protéines et des acides aminés, pour leur développement. Un membre remarquable de la famille des *Halobacteriaceae* est *Halobacterium salinarum*. Ce dernier réalise une photosynthèse en l'absence de pigments chlorophylliens grâce à une membrane pourpre contenant 4 différentes rhodopsines dont la bacteriorhodopsine et la halorhodopsine.

-Les thermophiles extrêmes métabolisant le S⁰ : Ce groupe physiologique comprend le seul ordre des *Thermococcales*, anaérobies stricts, ces derniers réduisent le soufre en sulfure.

-Les *Archaea* sulfato-reductrices : sont affiliées à l'ordre des *Archaeoglobales*, représenté par un seul genre : *Archaeoglobus*. Cette *Archaea* thermophile extrême (83°C) isolée de sources hydrothermales marines, utilise une variété de donneurs d'électrons (H₂, lactate, glucose) et réduit les sulfates, les sulfites ou les thiosulfates en sulfures. Le soufre élémentaire n'étant pas utilisé comme accepteur d'électrons. Cet organisme, particulier de part sa fonction de sulfato-réduction, possède également certaines des coenzymes caractéristiques des méthanogènes comme F₄₂₀ et la méthanoptérine.

I.B.2.Utilisation de la métagénomique pour prédire des métabolismes spécifiques d'*Archaea* non cultivées

Les progrès réalisés dans le domaine de la génomique environnementale rendent désormais possible une caractérisation du génome des organismes sans étape culturale (cf. Partie I de la revue bibliographique). Les premières études de métagénomique des *Archaea*, ont été initiées par DeLong et ses collaborateurs avec pour objectifs de caractériser des fragments génomiques d'*Archaea* du Nord-Est de l'Océan Pacifique (Stein *et al.* 1996). L'utilisation d'un chromosome bactérien artificiel[§] (CBA) dérivé d'un vecteur fosmide^{**} a permis la construction d'une librairie de larges inserts à partir d'échantillons planctoniques marins. Un fragment de 38,5 kb appartenant à une *Crenarchaeota* non cultivée a été identifié parmi 3552 clones, en utilisant des sondes ADN_r16S spécifiques des *Archaea* (FOS-4B7, Groupe I-1a) et le séquençage de ce clone a confirmé son origine archéenne. A partir de cette étude, la stratégie CBA a permis d'isoler plusieurs fragments génomiques d'*Archaea* issues des eaux de surface (Beja *et al.* 2000, 2002) ou des eaux profondes (Lopez-Garcia *et al.* 2004, Moreira *et al.* 2004) des océans Pacifique et Antarctique.

[§] BAC : bacterial artificial chromosome, capable de se maintenir de façon stable à une ou deux copies par cellules dans *E. Coli*. Ce vecteur de clonage peut accepter jusqu'à 300 Kb.

^{**} Fosmide : Dérive du facteur F simple copie d'*E. Coli* et accepte des inserts de 35 à 45 Kb.

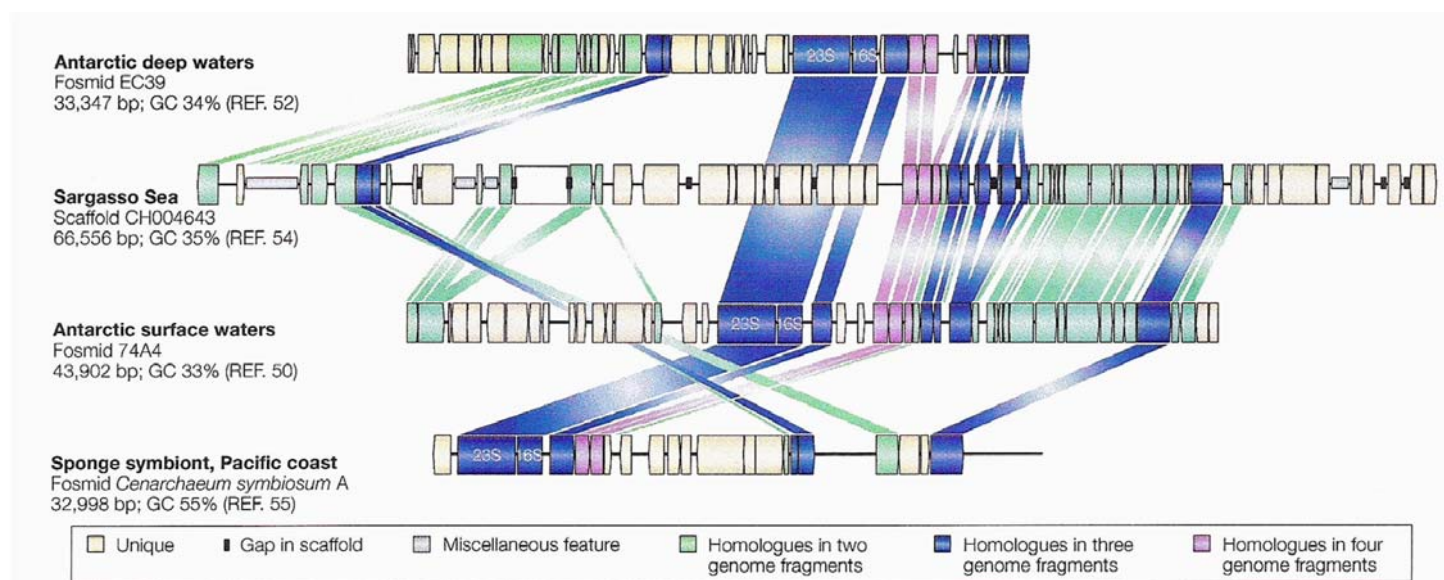


Figure S. 23: Conservation des régions génomiques des *Crenarchaeota* marines non cultivées. Cette figure présente une comparaison des régions génomiques de *Crenarchaeota* marines non cultivées issues de différents environnements de 4 régions océaniques. Cette analyse révèle de fortes similarités dans les séquences et l'ordre des gènes. Des gènes orthologues* présentant un score >50 (avec blastp) ont été identifiés. D'après Schleper *et al.* 2005

L'étude réalisée par **Venter *et al.* (2004)** sur la Mer des Sargasses a mis en évidence des séquences partielles et complètes du gène ARNr16S et d'autres marqueurs phylogénétiques indiquant la présence de *Crenarchaeota* et d'*Euryarchaeota*. Un exemple de construction, "CH004643", réalisé à partir de cette banque de données relie 3 fragments de *Crenarchaeota* isolés de différentes régions océaniques (Figure S. 23).

■ **LES CRENARCHAEOTA DES SOLS POURRAIENT ETRE DES NITRIFIANTES** (Figure S. 28): Des séquences d'ARNr16S de *Crenarchaeota* de strates supérieures des sols peuvent être retrouvées sur tous les continents et dans la plupart des écosystèmes terrestres. Présentant des similarités avec les *Crenarchaeota* marines, ces espèces apparaissent affiliées au Groupe I-1b (avec quelques exceptions comme le groupe FFS des écosystèmes forestiers, **Jurgens *et al.* 1997**). Plusieurs larges fragments génomiques ont été isolés de bibliothèques complexes construites à partir d'échantillons de sol (**Quaiser *et al.* 2002, 2003, Treuch *et al.* 2004**). La structure des opérons ARNr, l'analyse phylogénétique, le contenu en GC, et les protéines prédites confirme une origine crenarchéenne de ces fragments. D'autre part, certains gènes fournissent des indications quant au métabolisme énergétique putatif de ces *Archaea*. Ainsi, l'identification de deux gènes codant pour des protéines relatives des sous unités de l'ammonium monooxygénase (AmoAB), (enzymes centrales impliquées dans l'oxydation de l'ammonium chez les bactéries nitrifiantes, **Arp *et al.* 2002**), suggère que ces *Archaea* non thermophiles utilisent l'ammonium comme source d'énergie. Les protéines de la famille de l'ammonium monooxygénase avaient été uniquement détectées chez les *Proteobacteria*, et l'identification de ces nouveaux gènes homologues étend ainsi cette famille enzymatique au groupe des *Archaea*. Des homologues des gènes Amo identifiés chez des *Crenarchaeota* du sol ont également été détectés dans la banque de données de la mer des Sargasses, suggérant que les *Crenarchaeota* marines sont également capables de réaliser l'oxydation de l'ammonium. Cette hypothèse couplée à la mise en évidence de *Crenarchaeota* marines autotrophes (**Wuchter *et al.* 2003**), laissent penser que certains groupes de *Crenarchaeota* marines non thermophiles pourraient être chimiolithoautotrophes^{††} oxydant l'ammonium (nitrifiantes). Un homologue de la nitrite-reductase, enzyme clé du processus de nitrate réduction, présentant un cofacteur cuivre a également été identifié dans des clones issus d'échantillons de sol (**Zumft 1997**) et de la mer des Sargasses. Cette protéine est également présente chez les nitrifiantes oxydant l'ammonium et pourrait avoir un rôle clé dans leur métabolisme. Cette donnée fournit des arguments supplémentaires à l'hypothèse d'un métabolisme énergétique crenarchéen, dans les environnements mésophiles terrestres et marins, basé sur l'oxydation de l'ammonium.

^{††} Chimiolithotrophes : Source d'énergie chimique (inorganique), donneurs inorganiques d'H/e⁻, CO₂ comme source de carbone.

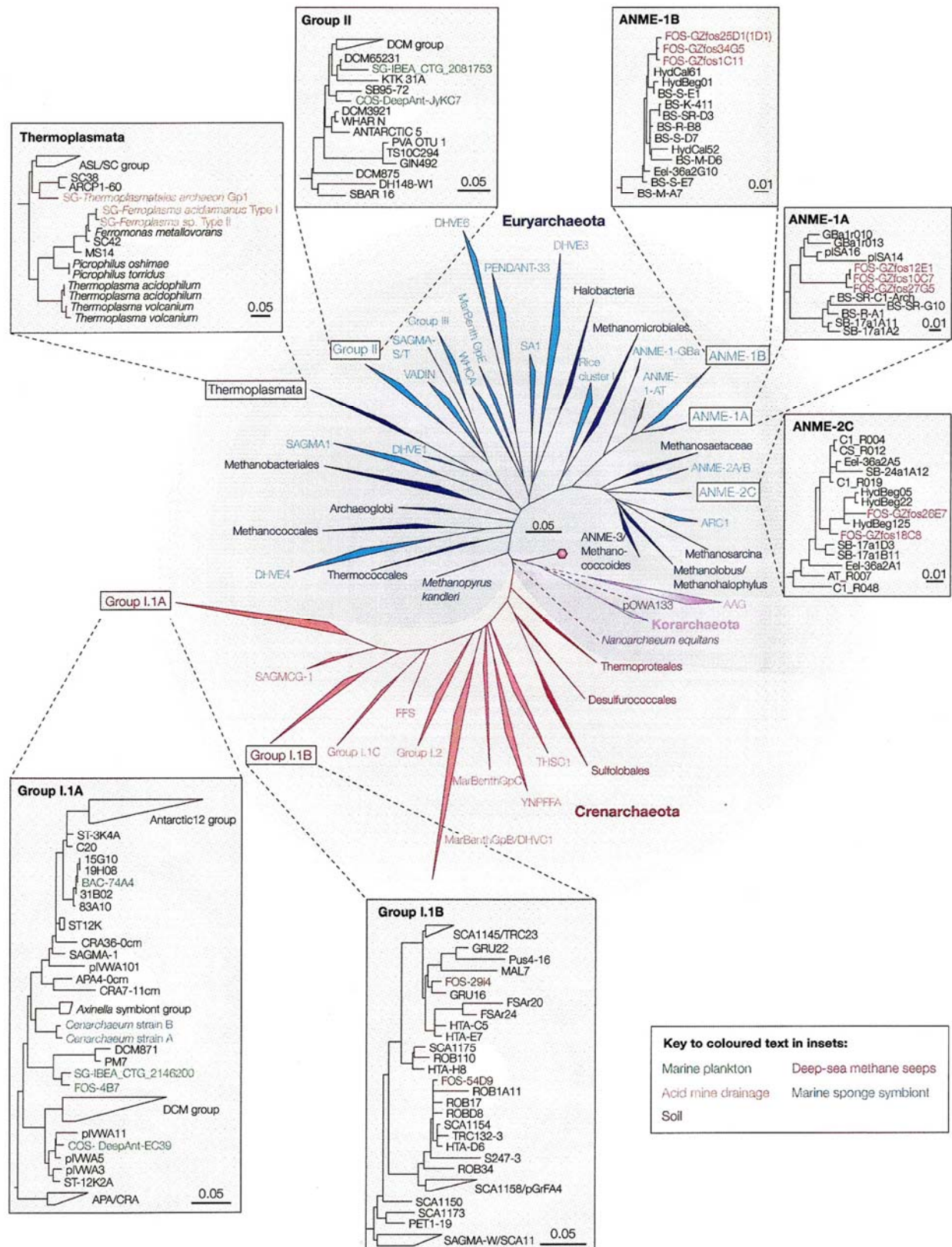


Figure S. 24: Le domaine des *Archaea* de la diversité à la fonction : L'arbre phylogénétique des *Archaea* présentent les différents groupes d'*Archaea* non cultivées mis en évidence dans les approches de génomique. Les séquences issues de Fosmides (FOS), Cosmides (COS), chromosome bactérien artificiel (BAC) ou les séquences issues d'assemblages par Shot-gun sont présentées dans les cadres autour de l'arbre central. D'après Schleper *et al.* 2005.

✚ ARCHAEA OXYDANT LE METHANE DANS LES SEDIMENTS MARINS (Figure S. 24) : Différentes lignées d'*Euryarchaeota*, non cultivées, (ANME-1, ANME-2, ANME-3) ont été détectées dans la partie supérieure des sédiments marins en relation avec des réservoirs profonds de méthane (**Boetius et al. 2000, Orphan et al. 2001 b, 2002, Hinrichs et al. 1999**). Des analyses *in situ* réalisées sur les lipides, les signatures isotopiques, ainsi que sur les séquences ARNr16S, ont indiqué que ces *Archaea* appartenant aux lignées ANME pourraient être méthanotrophes en convertissant le méthane en CO₂. Ce processus serait, dans ces écosystèmes, réalisé en association avec des bactéries sulfato-réductrices (**Boetius et al. 2000, Orphan et al. 2001 a et b, 2002, Hinrichs et al. 1999**). Les gènes codant pour la Méthyl coenzyme M réductase (MCR) qui catalyse l'étape terminale de la méthanogénèse ont été retrouvés dans les lignées ANME (**Hallam et al. 2003**). Un nouveau variant nickel du cofacteur F430 MCR des *Archaea* méthanogènes a été caractérisé dans une étude combinant approches biochimique et génomique (**Kruger et al. 2003**). L'hypothèse actuellement admise est que les *Archaea* des groupes ANME réalise une méthanogénèse inverse. Cette prédiction a été récemment supportée par **Hallam et ses collaborateurs (2004)** qui ont isolé l'ensemble des gènes typiquement associés à la production de méthane grâce une approche combinant "shot-gun" et librairies de larges inserts à partir d'échantillons enrichis issus de sédiments marins profonds.

I.C. Conclusions

Les travaux pionniers réalisés sur des isolats d'*Archaea* hyperthermophiles et d'autres extrêmophiles n'ont pas seulement conduit à la découverte de nouveaux métabolismes et d'adaptions spécifiques, mais également à la connaissance fondamentale des traits particuliers qui unifient le troisième domaine de la vie. Actuellement 45 génomes d'*Archaea* cultivables ont été séquencés (**Allers et Mevarech 2005**), et les études comparatives des génomes confirment bien que les composantes informationnelles des *Archaea* (réplication, transcription, traduction, systèmes de réparation de l'ADN) présentent des similarités plus importantes avec les eucaryotes (**Forterre et al. 2002, Makarova et Koonin 2003**). En terme de taille réduite et d'organisation de la structure de leurs gènes et de leurs opérons, les génomes archéens sont typiquement procaryotes. Ceci est en accord avec le statut prédis par Carl Woese, il y a 25 ans, plaçant les *Archaea* dans un domaine unique, séparé des deux domaines initiaux.

La diversité du génome des *Archaea* reflète leur versatilité physiologique, une large gamme de conditions de croissance, ainsi que l'acquisition de gènes par des transferts latéraux (**Makarova et Koonin 2003**). Les différentes études de génomiques ou de métagénomiques ont mis en relief le caractère cosmopolite et ubiquiste des *Archaea* mais ont également ouvert de nouvelles

perspectives de recherche : accéder à la connaissance de leurs impacts écologiques et des interactions que les *Archaea* peuvent établir avec les autres formes de vie. La génomique des *Archaea* révélera peut être également l'existence d'*Archaea* pathogènes, ou de nouveaux groupes non accessibles par les approches PCR classiques. L'isolement et la caractérisation d'espèces affiliées à de nouveaux groupes archéens non cultivés, représentent des perspectives particulièrement stimulantes. Cependant, si l'étude de modèles archéens est cruciale, les approches de métagénomique sont devenues indispensables pour comprendre la diversité et le rôle écologique de ces microorganismes. Ces méthodologies apportent notamment des informations sur le métabolisme potentiel de plusieurs nouveaux groupes d'*Archaea* et permettent de poser les bases des études écologiques du rôle de ces espèces dans un contexte géochimique. La prédiction de ces métabolismes spécifiques peut également permettre de développer et d'optimiser des conditions de cultures spécifiques pour l'isolement de ces nouveaux modèles archéens.

II- LES EUBACTERIA

Sur la base des connaissances acquises par des approches culture dépendante et/ou indépendante, il apparaît que la diversité taxonomique et phénotypique des Eubactéries dépasse largement celle des *Archaea*. A partir de 1996, la vulgarisation des technologies PCR dépendantes, et la rapidité avec laquelle une séquence d'acide nucléique peut être établie ont contribué à augmenter très significativement le nombre de nouvelles entrées de séquences ARNr16S dans la banque de données GenBank. Ainsi, durant la seule année 2002, 9500 séquences d'*Eubacteria* ont été ajoutées (Figure S. 25).

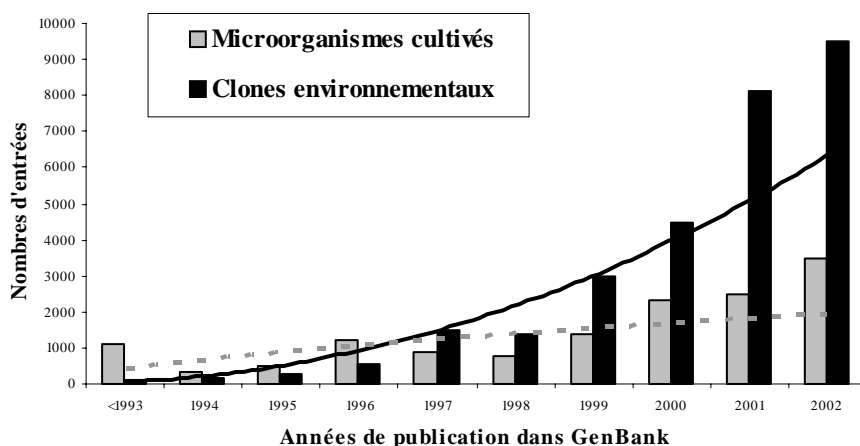


Figure S. 25 : Estimation du nombre de nouvelles entrées de séquences ADNr16S dans GenBank de 1993 à 2002. Toutes les séquences entrées avant 1993 sont incluses dans <1993. Ce graphique a été réalisé à partir des données publiées par Rappé et Giovannoni (2003).

L'enrichissement constant des banques de données ARNr16S, notamment par des clones environnementaux non cultivés, entraîne une évolution permanente de l'arbre phylogénétique des Eubactéries, et conduit à un certain nombre d'interrogations, quant au nombre de phyla bactériens. **Hugenholtz et ses collaborateurs (1998a, 2002)** ont identifiés 36 phyla bactériens, parmi lesquels un tiers ne présente pas d'isolat cultivé ; **Rappé et Giovannoni (2003)** en ont discerné 52 dont 26 sans représentant cultivé. Plusieurs raisons expliquent l'ambiguïté dans la détermination du nombre exact de phyla bactérien. Certaines lignées ne sont représentées que par un petit nombre de séquences ARNr16S, ainsi, 13 phyla incluent moins de 5 séquences complètes (>1300 nucléotides). D'autre part, certaines lignées, présentant de longues branches sur les arbres phylogénétiques, ne sont séparées des autres phyla que par de courts nœuds internes. Il apparaît également que certains groupes phylogénétiques comme les *Firmicutes* ou la classe des *Delta-Proteobacteria* ne remplissent pas complètement les caractéristiques d'un groupe monophylétique et pourraient en réalité constituer plusieurs lignées distinctes (**Ludwig et Klenk 2001**). L'enrichissement des banques de séquences, l'évolution des méthodes de phylogénie et les approches de génomiques comparées (**Snel et al. 1999, Wolf et al. 2001**) permettront certainement d'affiner les relations évolutives de ces différentes lignées.

Sur la base du positionnement phylogénétique des séquences ARNr16S, les différents phyla eubactériens ne présentent aucune homogénéité de leurs traits phénotypiques. Ces derniers sont très étendus chez les Eubactéries et un inventaire des différentes fonctions connues est utopique, aussi, seule l'évolution des connaissances sur la phylogénie des *Eubacteria* sera abordé dans cette section. et quelques exemples de phyla revêtant un intérêt écologique particulier seront présentés.

II. A. Les premiers pas de l'affiliation phylogénétique des *Eubacteria*

Au début des années 1980, Woese et ses collaborateurs ont initié l'analyse des relations phylogénétiques d'*Eubacteria* cultivées sur la base du polymorphisme de l'ARNr16S (**Fox et al. 1980, Gibson et al. 1985, Stackebrandt et Woese 1981, Woese et al. 1985**), et en 1987 une publication de synthèse réunie l'ensemble des données acquises ("*Bacterial evolution*", **Woese 1987**). Sur la base de ce catalogue de séquences, 11 lignées majeures ont été déterminées, ces dernières ont été depuis, successivement assignées à différents rangs taxonomiques : phylum (**Hugenholtz 2002**), classe (**Stackebrandt et al. 1988, 1997**), ordre (**Schlesner et Stackebrandt 1986**) et division (**Hugenholtz et al. 1998a, 1998b**).

L'arbre intégrant les relations phylogénétiques entre les membres du domaine des *Eubacteria* est présenté sur la [Figure S. 26](#).

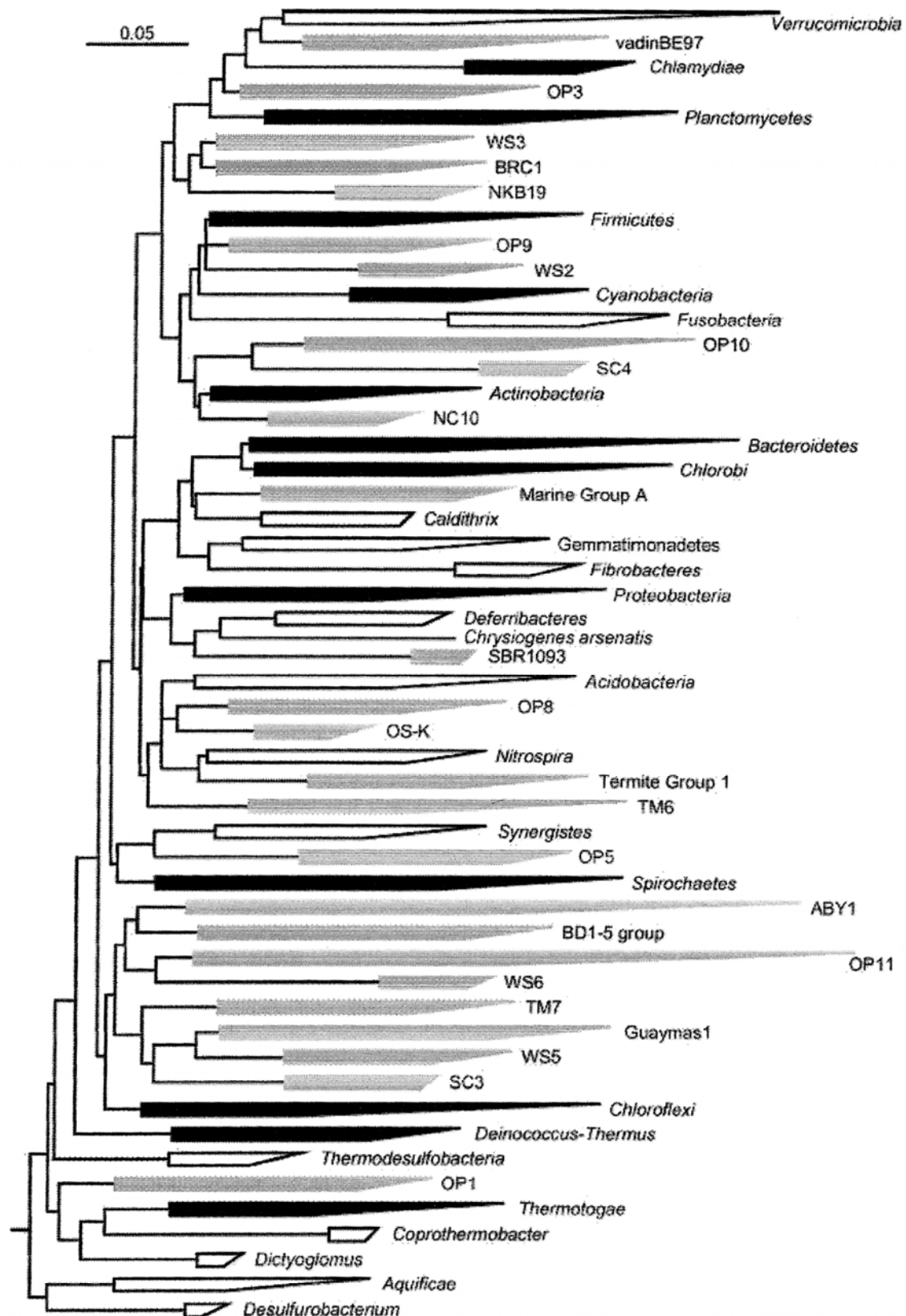


Figure S. 26 : Arbre phylogénétique du domaine des *Eubacteria*. Les lignées en noir correspondent aux 12 phyla initiaux, décrits par Woese (1987) sur la base d'espèces cultivées. Les lignées représentées en blanc correspondent aux 14 phylas additionnels. Les lignées en gris correspondent aux 26 phyla candidats ne possédant pas de représentants cultivés. D'après Rappé et Giovannoni 2003

Les 11 phyla originaux reconnus en 1987 correspondent aux 12 lignées en noir –les bactéries Gram-positives ayant depuis été séparées en 2 phyla distincts, les *Firmicutes* (faible % G+C) et les *Actinobacteria* (haut % G+C)-. Parmi les phyla initialement décrits, les *Proteobacteria* (**Stackebrandt et al. 1988**) illustrent le modèle classique des bactéries Gram-négatives et sont généralement reconnues comme un des groupes présentant un des plus large succès écologique (**Buckley et Schmidt 2002 ; Giovannoni et Rappé 2000 ; Zwart et al. 2002**). Ce phylum comprend notamment deux des genres les plus étudiés de microorganismes, *Escherichia* et *Pseudomonas* (**Galvez et al. 1998**). Les 12 phyla initiaux incluent également les *Cyanobacteria*, ou bactéries réalisant une photosynthèse oxygénique, et les *Thermotogae*, bactéries fermentatives hétérotrophes anaérobies strictes (**Huber et al. 1992**). Certains résultats surprenants sont également mis en évidence dans ce premier arbre phylogénétique. Par exemple, le phylum des *Chloroflexi* (bactéries vertes non soufrées) inclue les genres *Chloroflexus* (phototrophe thermophile), *Herpetosiphon* (chimiohétérotrophe mésophile), et *Thermomicrobium* (chimiohétérotrophe hyperthermophile) (**Oyaizu et al. 1987**). Ainsi, ces microorganismes exhibant des stratégies métaboliques extrêmement divergentes sont réunis au sein d'un même phylum, suggérant une histoire évolutive similaire. Un autre exemple est l'affiliation des genres *Cytophaga*, *Bacteroides* et *Flavobacterium* au sein d'une lignée majeure (**Paster et al. 1985**)- réunie actuellement dans le phylum des *Bacteroidetes* (**Garrity et Holt 2001**)-bien qu'aucune évidence phénotypique ne viennent accréditer l'intégration de ces microorganismes dans un phylum bactérien unique et cohérent.

II.B. L'arbre évolutif des Eubactéries depuis 1987.

II.B.1. Phyla additionnels présentant des membres cultivés

Depuis 1987, 14 phyla additionnels (représentés sur la [Figure S. 30](#) en traits blancs), avec des représentants cultivés, ont été identifiés parmi les *Eubacteria* (**Pace 1997, Hugenholtz et al. 1998a, Hugenholtz 2002**). Parmi ces derniers, plusieurs comprennent des microorganismes thermophiles, incluant les *Aquificae*, *Thermodesulfobacteria*, *Dictyoglomi*, *Coprothermobacteria*, *Caldithrix* et *Desulfurobacteria*. Les membres cultivés de la plupart de ces phyla ont un mode de croissance chimolithoautotrophe, comme les *Aquificae* qui est le mieux connu pour la capacité de certaines espèces à utiliser l'H₂ comme source énergétique (**Huber et al. 1992**), les *Thermodesulfobacteria* qui croissent par réduction anaérobie des sulfures (**L'Haridon et al. 1998**), et *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* qui est une espèce bactérienne sulfato-réductrice (**Jeanthon et al. 2002**). Il est intéressant de constater que certains de ces phyla, comprenant des bactéries thermophiles, présentent un ancrage précoce au sein de l'arbre phylogénétique.

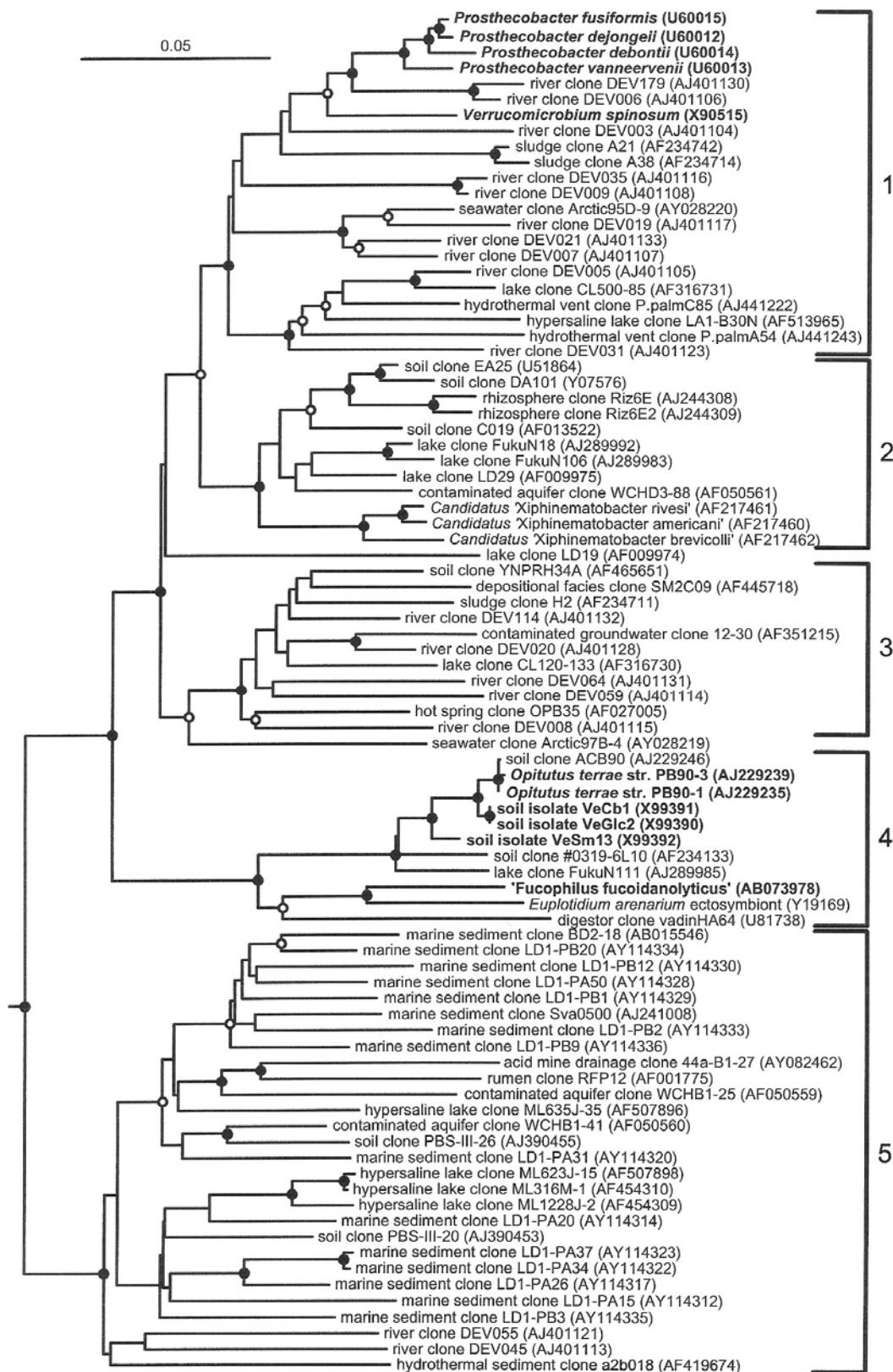


Figure S. 27 : Dendrogramme de 80 séquences ADN r16s complètes illustrant les relations phylogénétiques entre les membres du phylum des *Verrucomicrobia*. Les sous-groupes 2, 3 et 5 ne contiennent pas de représentants cultivés. D'après Rappé et Giovannoni 2003.

Additionnellement à ces "phyla thermophiles", le phylum, récemment reconnu, des *Acidobacteria* (Ludwig *et al.* 1997) est particulièrement notable en raison du caractère ubiquiste et de l'abondance de ce groupe dans l'environnement, particulièrement dans les sols (Barns *et al.* 1999, Buckley *et al.* 2002). Ce phylum inclut trois espèces cultivées présentant des caractéristiques physiologiques divergentes (*Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida* et *Geothrix fermentans*) rendant difficile la prédiction des rôles écologiques des microorganismes affiliés aux *Acidobacteria* (Hugenholtz *et al.* 1998a, Barns *et al.* 1999). Le phylum des *Nitrospira* est également remarquable, ce dernier inclut des membres écologiquement importants comme le genre *Nitrospira* (chimolithotrophe^{‡‡} oxydant les nitrites, Elhrich *et al.* 1995) et le genre *Leptospirillum* impliqué dans l'oxydation du fer ferreux (Hippe 2000, Markosyan 1972). Les membres de ce phylum apparaissent également ubiquistes dans les environnements naturels (Hentschel *et al.* 2002, Holmes *et al.* 2001, Todorov *et al.* 2000). Approximativement 26 phyla bactériens présentent actuellement des isolats. Pour certains, le petit nombre d'isolats ne reflète cependant pas le caractère cosmopolite et ubiquiste de la division que laisse entrevoir les méthodes de clonage direct. Deux publications (Hugenholtz *et al.* 1998a, Rappé *et al.* 2003) ont traité à ce sujet, et ne seront abordés dans cette section que deux phyla particuliers en raison de leurs abondances dans les environnements naturels suggérant des rôles écologiques significatifs.

- **LE PHYLUM DES VERRUCOMICROBIA** a été reconnu depuis 1995 (Hedlund *et al.* 1997, Ward-Rainey *et al.* 1995) mais n'est actuellement représenté que par un petit nombre de microorganismes isolés en culture. Initialement, les *Verrucomicrobia* comprenaient 2 genres et 5 espèces hétérotrophes aérobies isolées à partir d'écosystèmes aquatiques continentaux : *Verrucomicrobium vinosum*, *Prostheco bacter fusiformis*, *P. debontii*, *P. vaneervenii*, *P. dejongeii* (Hedlund *et al.* 1996, 1997). Récemment, une espèce anaérobie hétérotrophe (*Opitutus terrae*) affiliée aux *Verrucomicrobia* a été isolée et caractérisée dans des échantillons de rizière (Chin *et al.* 2001). Le dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques entre les *Verrucomicrobia* révèle 5 groupes distincts (Hugenholtz *et al.* 1998a) : trois ne présentent pas d'isolats et deux sont dominés par des séquences issues de clonage direct (Figure S. 27). La subdivision 1 contient les genres *Prostheco bacter* et *Verrucomicrobium* et apparaît dominée par des espèces originaires des écosystèmes aquatiques continentaux. Les sub-divisions 2 à 4 sont majoritairement représentées par des séquences originaires du sol et des eaux douces alors que le groupe 5 est dominé par des clones issus d'écosystèmes marins

^{‡‡} Chimolithotrophe : Source d'énergie chimique (inorganique), donneurs inorganiques d'H/e⁻, CO₂ comme source de carbone.

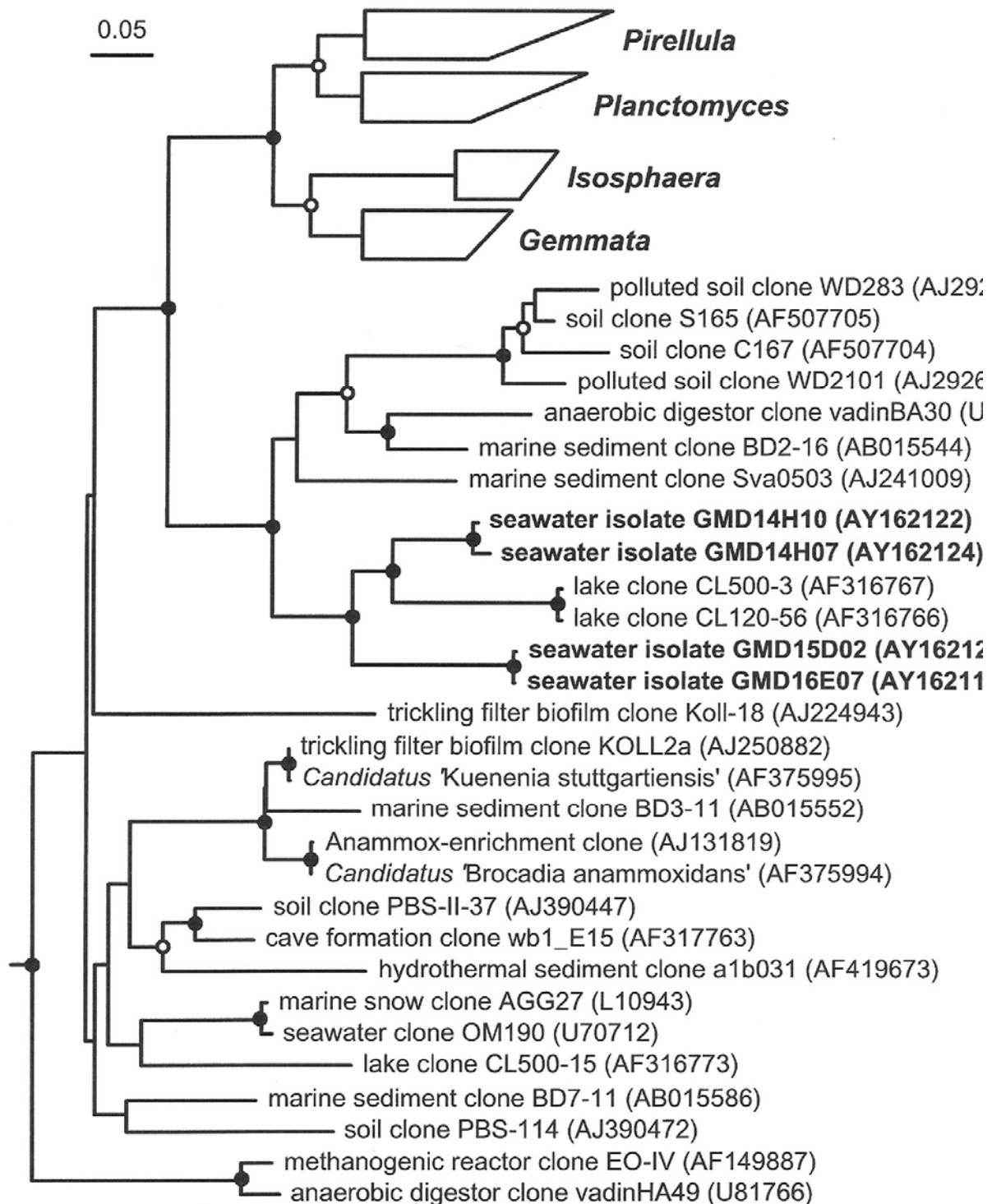


Figure S. 28 : Dendrogramme de séquences ADNr16s complètes illustrant les relations phylogénétiques entre les membres du phylum des *Planctomycetes*. D'après Rappé et Giovannoni 2003.

- Les *Planctomycetes* et les *Chlamydia* sont les seuls phyla eubactériens pour lesquels les espèces ne possèdent pas de peptidoglycane au niveau de leurs parois cellulaires. Les premiers isolats du phylum des *Planctomycetes* ont été obtenus dans les années 1970 et 4 genres, formant un clade cohérent, sont actuellement reconnus : *Pirellula*, *Planctomyces*, *Isosphaera* et *Gemmata* (Figure S. 28). Dès les premières applications du clonage direct des gènes à partir de l'environnement, il est néanmoins apparu évident que la prévalence environnementale des *Planctomycetes* était supérieure à celle suggérée par les collections de cultures (DeLong *et al.* 1993, Liesack et Stackebrandt 1992). Les *Planctomycetes* sont en effet cosmopolites et retrouvées dans de nombreux écosystèmes (sol, sédiments marins ou lacustres, sources chaudes). Si les premiers isolats obtenus présentaient un mode de croissance hétérotrophe (Bauld et Staley 1976, Schmidt 1978, Staley 1973), les connaissances sur la diversité physiologique de ces microorganismes se sont accrues avec la découverte de microorganismes responsables de l'oxydation anaérobie de l'ammonium (réaction anammox (Strous *et al.* 1999), cf. Revue bibliographique Partie III). Considérant la remarquable physiologie des espèces impliquées dans ce processus, dont le représentant cultivé a été provisoirement dénommé *Brocadia anammoxidans* (Strous *et al.* 1999), il apparaît probable que le phylum des *Planctomycetes* révélera des caractéristiques phénotypiques particulièrement surprenantes.

II.B.2. Emergence des "Divisions Candidates"

L'extension des méthodes basées sur les séquences de l'ADNr16S pour l'identification des microorganismes dans les environnements naturels a précocement révélé que certaines d'entre elles n'appartenaient à aucun phylum bactérien possédant des représentants isolés (Furhman *et al.* 1993, Liesack et Stackebrandt 1992 ; Stackebrandt *et al.* 1993, Ward *et al.* 1992, Weller *et al.* 1992). De nombreux artefacts (chimères, erreurs de PCR ou de séquençage) et erreurs méthodologiques (mauvaise référence ou mauvaise sélection de l'organisme référence, alignement approximatif, quantité d'informations de la séquence insuffisante) peuvent (et très certainement doivent dans certains cas !) conduire à un positionnement erroné de la séquence ARNr16S au sein de l'arbre phylogénétique. Cependant, l'observation à partir d'études indépendantes de séquences issues de l'environnement formant des groupes monophylétiques supporte la conclusion que la majorité de ces clones sont correctement affiliés et forment des lignées majeures, ne présentant pas d'isolats cultivés, à l'intérieur du domaine des *Eubacteria*. Ces lignées, dénommées "Division Candidate" (Hugenholtz *et al.* 1998a et b), présentent une divergence suffisante avec les lignées bactériennes connues pour leur attribuer une position phylogénétique propre et les considérer comme des phyla selon le sens défini par le *Bergey's*

Manual of Systematic Bacteriology (Boone *et al.* 2001). Le concept de "Division Candidate" bien qu'existant depuis 1998 n'était pas précisément défini en terme de phylogénie, et seulement trois groupes de séquences étaient supposés composer trois clades Candidats dans le domaine *Eubacteria* :

■ Le groupe OS - K : séquences issues de la source chaude Octopus (Ward *et al.* 1992, Weller *et al.* 1992).

■ Le Groupe Marin A : séquences issues d'échantillons de bacterioplankton de l'Océan Pacifique (Furhman *et al.* 1993, Gordon et Giovannoni 1996).

■ Le groupe termite I : clones issus de l'intestin du termite *Reticulitermes speratus* (Ohkuma et Kudo 1996).

En 1998, le laboratoire de Norman Pace propose de construire un concept cohérent et un cadre universel pour l'identification et la caractérisation des séquences appartenant à des phyla candidats (Dojka *et al.* 1998, Hugenholtz *et al.* 1998a, 1998b). Les Divisions Candidates sont ainsi définies comme "*an unaffiliated lineage in multiple analyses of datasets with varying types and numbers of taxa and having <85% identity to reported sequences, indicating its potential to represent a new bacterial division [phylum]* " et "*as a lineage consisting of two or more 16S rRNA sequences that are reproducibly monophyletic and unaffiliated with all other division [phylum]-level relatdness groups that constitute the bacterial domain*" (Dalevi *et al.* 2001, Hugenholtz *et al.* 1998a).

Les définitions précédentes impliquent que deux points doivent être strictement respectés pour l'établissement d'un nouveau phylum candidat. Les séquences analysées doivent être complètes (>1300 nucléotides), en effet les séquences partielles (de 300 à 600 nucléotides) sont suffisantes pour l'affiliation d'un clone présentant des homologies avec des lignées définies mais insuffisantes pour le positionnement phylogénétique de lignées distinctes. L'établissement d'un nouveau phylum Candidat doit résulter de l'analyse de plusieurs séquences et dériver préférentiellement de bibliothèques de clones construites à partir d'amplification PCR indépendantes.

Sur la base de ces deux règles directrices, Hugenholtz *et al.* (1998a) ont décrits 12 nouvelles lignées potentiellement Candidates à partir d'échantillons d'une source thermale du Yellowstone. Sept d'entre elles sont représentées sur l'arbre (préfixe OP, [Figure S. 26](#)). La même année, Dojka *et al.* (1998) ont décrits 6 nouvelles lignées (dont 5 apparaissent sur la [Figure S. 26](#) sous le préfixe WS) pouvant potentiellement former des Divisions Candidates à partir d'un aquifère contaminé par des solvants chlorés et des hydrocarbures.

OP11 division

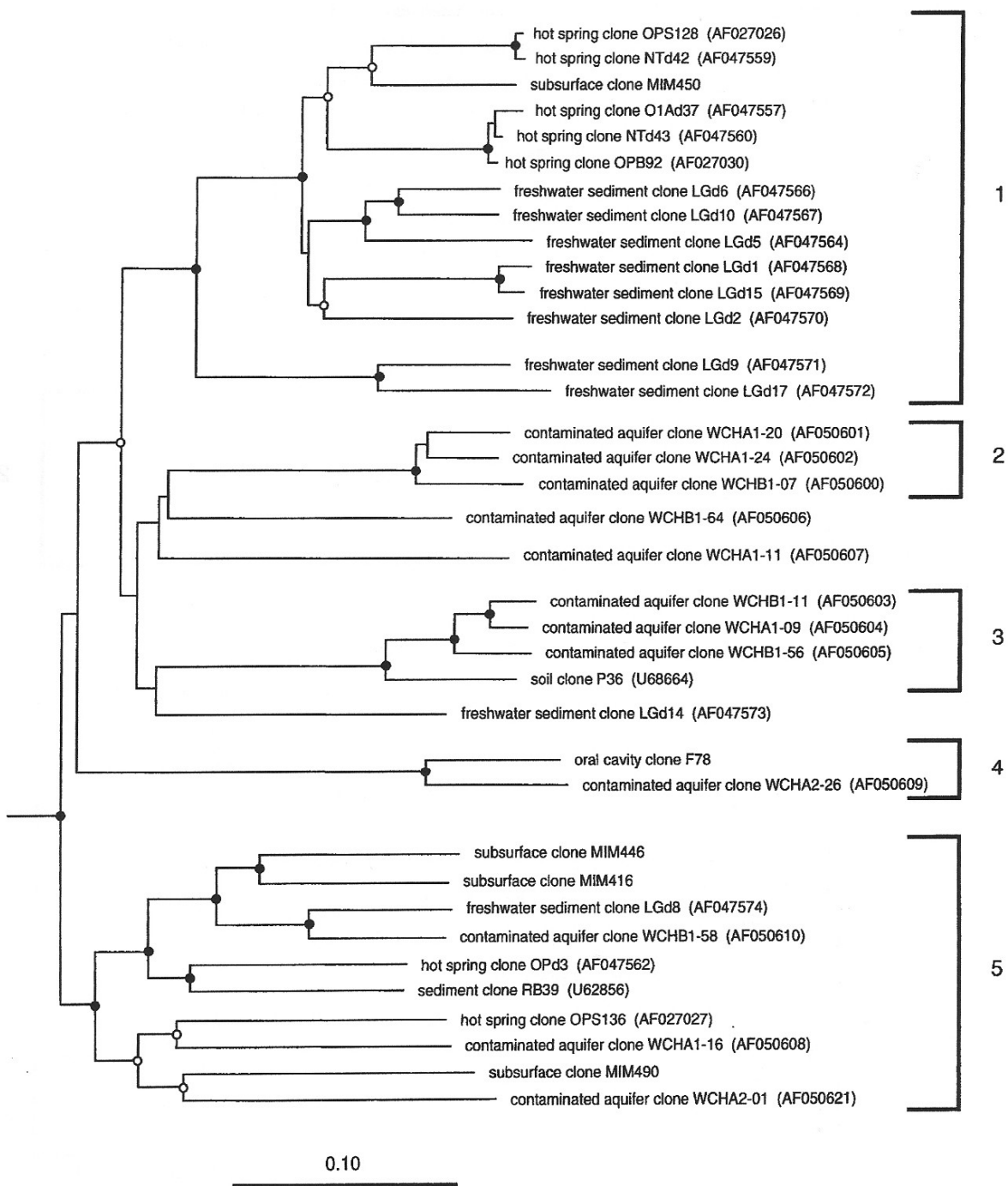


Figure S. 29 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques entre les membres de la division candidate OP11. La source environnementale de chaque séquence est indiquée devant le nom du clone. D'après Hugenholtz *et al.* 1998a.

Le nombre de phyla Candidats est en perpétuelle évolution (Figure S. 26), ainsi les phyla SC3 et SC4 ont été identifiés à partir de sol arides (**Dunbar *et al.* 2002**), ABY1 à partir d'échantillons lacustres et de sédiments marins (**Urbach *et al.* 2001**), BRC1 identifié à partir d'échantillons de sol et de rizière (**Derakshani *et al.* 2001**), NC10 issues de formation microbienne dans des grottes immergées (**Holmes *et al.* 2001**), Guaymas 1 identifiés à partir de sédiments marins hydrothermaux (**Teske *et al.* 2002**), NKB19 à partir de sédiments marins et de boues activées (**Hugenholtz *et al.* 2001, Li *et al.* 1999**), SBR1093 identifié à partir de boues activées (**Hugenholtz *et al.* 2001**).

Au sein de ces Divisions Candidates, la Division OP11 est la plus largement distribuée dans l'environnement (Figure S. 29). Initialement mises en évidence dans une source chaude du Yellow Stone National Parc (Obsidian Pool, **Hugenholtz *et al.* 1998b**), des séquences ADN_r16S affiliées à cette division ont été depuis détectées dans des sédiments marins et lacustres (**Li *et al.* 1999**), dans des sources géothermales (**Hugenholtz *et al.* 1998a**), dans des sols (**Borneman et Triplett 1997**), dans la cavité orale humaine (**Paster *et al.* 2001**) et dans un aquifère contaminé aux hydrocarbures (**Dojka *et al.* 1998**). Le clade OP11 est monophylétique et pourrait représenter la division la plus diversifiée du domaine des *Eubacteria* (**Harris *et al.* 2004**). Aucun représentant cultivé ne permet de spéculer sur la fonction putative de ce groupe et leurs propriétés physiologiques restent énigmatiques. Néanmoins, la distribution environnementale des séquences OP11, généralement rencontrées dans des écosystèmes réducteurs caractérisés par la présence de composés soufrés comme les sulfates ou les sulfites, suggère l'implication de ce groupe dans le cycle biogéochimique du soufre (**Harris *et al.* 2004**).

II.C. Distribution des phyla d'*Eubacteria* dans l'environnement.

La richesse taxonomique des eubactéries et l'enrichissement constant des banques de données en séquences ADN_r16S, rendent complexe une analyse exhaustive de la distribution de ce domaine dans l'environnement. Une étude réalisée par **Hugenholtz et ses collaborateurs (1998a)** récapitule, à partir de 86 études, la distribution des clones ARNr 16S d'*Eubacteria* en fonction du type d'habitat (Tableau S. 8). Ce tableau n'intègre que les séquences ayant été détectées dans au moins deux études indépendantes et pour lesquelles une séquence ARNr 16S, au moins, est complète. Pour plusieurs divisions d'eubactéries, des séquences ont été identifiées dans une large gamme d'habitats suggérant une distribution cosmopolite ou ubiquiste de l'organisme correspondant et potentiellement de vastes capacités métaboliques.

			Principales divisions bactériennes																																			
Habitat type	Nombre d'études	Nombre de séquences	Proteobacteria																																			
			α	β	γ	δ	ε	Cytophagales	Actinobacteria	Firmicutes	Acidobacteria	Verrucomicrobia	Spirochetes	Nitrospira	GNS	OP11	Planctomycetes	Vertes soufrées	TM7	TM6	Thermus/Deinococcus	Cyanobacteria	Synergistes	OP8	Termite groupI	OS-K	Chlamydia	OP3	OP10	WS1	OP5	Marine groupe A	Fibrobacter	Flexistipes	Dictyoglomus	Thermotogales	Thermodesulfobacterium	Aquificales
Source géothermale	10	212	*	*		*		*			*		*	*		*	*				*					*										*		*
Sol	16	743	☐	*	*	*		*		☐	*	☐	☐			*																						
Océan	23	687	☐	*	☐	*		*	*	*		*					*						*															
Eau douce	4	107	☐	*					*		*																											
Traitement des eaux	5	430	☐	☐	☐	*		*	☐	*		*			*		*																					
Associé polluants	7	202	*	*	*	*	*	*	*	*	*																											
Acidité/Métaux	2	21	☐	*	☐			*	*	*	*			☐																								
Sub-surface	6	229	*	☐	☐	*	*		*	☐				*	*	*												*										
Symbiontes et Commensales	10	280			☐			*		*			*																									
Associé pathologie	3	7		*	*			*		*			*																									
Total	86	2918																																				

Tableau S. 8: Tableau synthétique de la distribution des différents phyla dans l'environnement. Etabli à partir des données de Hugenholtz *et al.* 1998a.

□ : >75% des séquences ADNr 16S de l'habitat

* : entre 25% et 75% des séquences ADNr16S de l'habitat

Pas de symbole : <25%

Les *Proteobacteria* sont représentées au niveau de la subdivision en raison de la large distribution de ce phylum

Certaines de ces divisions sont relativement bien représentées par des isolats en culture (Figure S. 30). Ainsi, les *Proteobacteria*, les *Cytophagales* et les deux divisions de bactéries Gram-positives-*Actinobacteria* et *Firmicutes*- représentent plus de 90% de l'ensemble des organismes cultivés. Par opposition, certaines divisions cosmopolites comme les *Acidobacteria*, les *Verrucomicrobia*, les bactéries vertes non soufrées (GNS) et la division candidate OP11 présentent peu (ou pas) d'isolats et leurs propriétés phénotypiques restent spéculatives. Si certaines divisions apparaissent largement distribuées, d'autres sont inféodées à un spectre restreint d'habitat. Tous les représentants cultivés des *Aquificales* sont des thermophiles métabolisant l'hydrogène, et l'ensemble des clones affiliés à ce phylum ont été identifiés à partir d'environnements extrêmes en température, suggérant des habitats très spécialisés pour ce groupe. Cependant, cette gamme d'habitat apparemment limitée peut également refléter des artefacts dans les stratégies d'échantillonnage ou des biais méthodologiques, et les représentants de ces divisions pourraient être plus largement distribués.

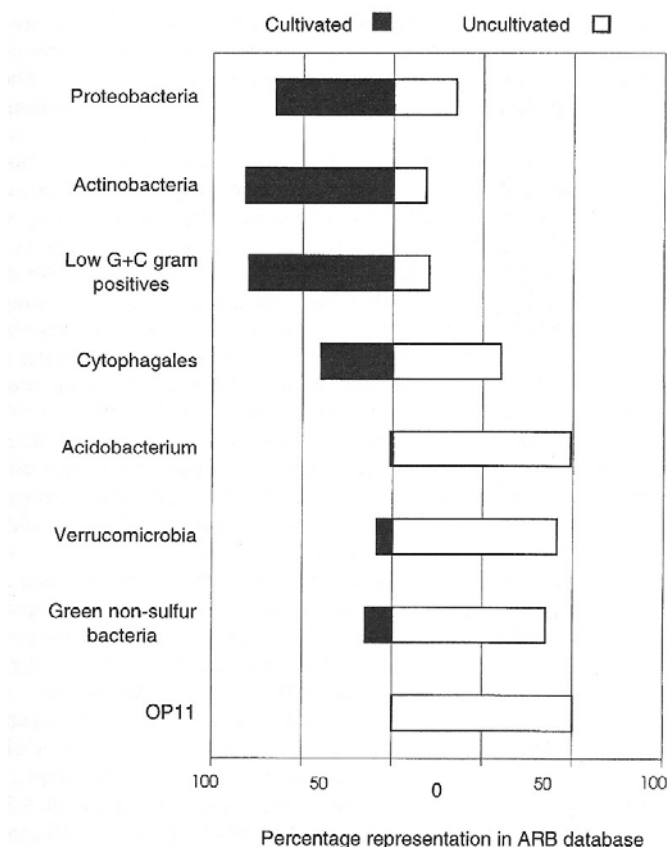


Figure S. 30: Exemples de phyla bactériens reconnus et de leur représentation par des isolats cultivés (d'après Hugenholtz *et al.* 1998 a).

III- REMARQUES ET CONSIDERATIONS GENERALES

L'acquisition permanente de connaissances sur la diversité microbienne, telle qu'elle est révélée par la topologie des arbres phylogénétiques, continuera très certainement d'étendre les limites des deux domaines procaryotiques. Cette immense diversité, dominée par des clones environnementaux "non-cultivés", met cependant en relief l'absence notable d'informations sur les propriétés physiologiques de la grande majorité des espèces et conduit à s'interroger sur les informations qui peuvent être tirées de la diversité des microorganismes non cultivés, autrement que de les cataloguer comme une liste d'espèces en attente de découverte. En effet, les faibles données disponibles sur les caractères phénotypiques pour bâtir une réelle taxonomie, la difficulté d'établir correctement les relations phylogénétiques à partir de la molécule d'ARNr16S entre les différents groupes microbiens, et la nature laborieuse et peu reproductible des hybridations ADN-ADN posent le problème de la définition de l'espèce bactérienne.

Dans le contexte des arbres phylogénétiques, les hypothèses de **Cohan (2001)** sur la spéciation bactérienne sont particulièrement intéressantes. Il suggère que la structure fine des arbres phylogénétiques révèle des "écotypes" et qu'il serait intéressant de définir une espèce bactérienne en tant qu'écotype. Le concept de la sélection périodique est central dans cette idée. Cette dernière se réalise lorsqu'un nouveau variant d'une espèce, présentant des aptitudes significativement supérieures à ses congénères, apparaît. Dans de larges populations asexuées, un tel variant peut éventuellement remplacer ses conspécifiques. Ainsi, si les clusters environnementaux sont la résultante de substitutions neutres s'accumulant au cours du temps, la sélection périodique élimine la diversité à l'intérieur des clusters, pour ne conserver que les descendants de la nouvelle cellule variante présentant le meilleur succès écologique. L'exemple choisi par **Rappé et Giovannoni (2003)**, le clade des oxyphototrophes marines, illustre particulièrement bien ce concept. Les cyanobactéries *Prochlorococcus* et *Synechococcus* sont ubiquistes dans les océans, physiologiquement diversifiés et présentent une réelle signification écologique mais forment un clade avec une faible divergence des séquences ARNr16S (>96% de similarité). Considérant, que l'ARNr16S subit un taux de mutations constant identique à celui des autres microorganismes (0,01-0,02 substitutions par site tout les 50 Ma, **Moran et al. 1993**), l'âge calculé de ce clade serait de 100 à 200 millions d'années, bien loin de l'histoire probable des cyanobactéries unicellulaires dans les océans. La surprenante identité de séquences à l'intérieur du clade des oxyphototrophes marines pourrait être interprétée comme l'évidence d'une sélection périodique, au cours de laquelle, une cellule de cyanobactérie planctonique aurait acquis un avantage génétique lui conférant des potentialités compétitives supérieures dans la zone photique des océans. Cet événement se situerait, sur la base

des données génétiques, à la période mésozoïque, longtemps après l'origine des cyanobactéries dans les océans (**Anbar et Knoll 2002**).

Si la discussion sur la notion d'écotypes reste spéculative, elle permet néanmoins de mettre en évidence un concept clé. En effet, notre vision "moderne" de la diversité microbienne, qui a émergé des études relatives à l'environnement, interprète non plus l'évolution des organismes comme la seule résultante des attributs physiologiques de ces derniers, mais considère leurs adaptations dans le cadre d'un contexte environnemental spécifique. Il apparaît probable que l'accroissement des données sur l'intégralité des génomes de différentes souches d'une même espèce permettra de fournir une mesure quantitative de la parenté des génomes et par conséquent de conférer un réel statut à la notion d'espèce (**Ward et Fraser 2005**). De même, l'analyse de membres de phylum peu (ou pas) représenté pourra permettre d'acquérir une vision plus claire de la réelle diversité des génomes microbiens et d'affiner à terme les relations phylogénétiques entre les différents phyla. La complémentarité entre la systématique microbienne, la biologie de l'évolution et la génomique contribuera d'autre part à la réévaluation du génome bactérien, en ne le considérant plus comme une entité statique, mais en intégrant l'impact des transferts latéraux de gènes entre et au sein d'une même espèce sur l'évolution microbienne (**Ward et Fraser 2005**).

III^{ème} PARTIE : PLACE DES ANAEROBIES AU SEIN DE LA BIOSPHERE.

"It is a lovely day in the San Francisco Bay area. But then, I'm a Homo Sapiens with a rather parochial definition of "lovely"-roughly 20-27°C, mostly sunny, atmosphere pressure of 1 bar, 21% O₂ and so on. "Frigid" cries the thermophile. "I can't take the low pressure" declares the barophile. "Too much oxygen" gasps the anaerobe." (Rothschild 2001)

Il a été établi depuis plus de 50 ans que l'atmosphère de la terre primitive était anoxique, et les premiers procaryotes anaérobies auraient colonisé la terre il y a 3,8 milliards d'années. Les bactéries photosynthétiques pourpres et vertes ont certainement été les précurseurs des premiers organismes capables de réaliser une photosynthèse oxygénique : les cyanobactéries. L'accumulation de l'oxygène dans la biosphère a sans nul doute conduit à une "période de crise" chez les organismes anaérobies résultant de la toxicité de l'O₂. Beaucoup d'anaérobies ont certainement disparu et ceux qui ont survécu se sont concentrés dans des niches écologiques où nous trouvons leurs descendants aujourd'hui (colonnes d'eau anoxique, sédiments marins ou lacustres, tapis microbiens, micro niches anaérobies (particules détritiques...), systèmes digestifs), alors que d'autres ont apparemment évolué en développant des stratégies de protection comme la super oxyde dismutase (ou la super oxyde réductase, **Jenney et al. 1999**) ou ont initié des rudiments de respiration oxygénée.

Dans les environnements anoxiques contemporains, l'hégémonie des procaryotes est assurée par la multiplicité des stratégies adaptatives développées en l'absence d'oxygène. Ces organismes ont en effet élaboré une variété de processus fermentatifs, ainsi que la capacité de coupler l'oxydation de substrats organiques avec la réduction de composés inorganiques autres que l'O₂. Les accepteurs d'électrons alternatifs à la respiration aérobie sont variés (nitrate, manganèse, fer, sulfate, protons, dioxyde de carbone, *etc.*) et traduisent bien les capacités d'adaptation des procaryotes en regard de leurs potentialités cataboliques et de l'optimisation des rendements énergétiques en réponse aux contraintes de leur environnement. Les capacités bioénergétiques plus restreintes des microorganismes anaérobies les contraignent néanmoins à établir entre eux d'étroites relations de coopération. Les pressions adaptatives régissant leurs spécialisations métaboliques sont ainsi certainement plus fortes que celles actant sur les bactéries aérobies et implique une spécialisation de leur machinerie cellulaire.

Ainsi, la réalisation des différentes fonctions métaboliques dans les environnement anaérobies est la résultante de l'action concertée d'un assemblage d'organismes établissant entre eux un tissu d'interactions : coopération, syntrophie, compétition.

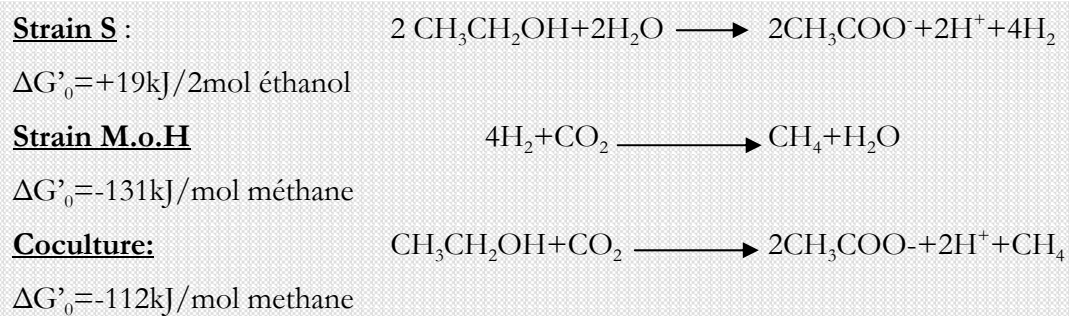


Figure S. 31: Conversion de l'éthanol en acétate et méthane *via* le couplage syntrophique des souches S et M.o.H (d'après Schink et Stams 2003).

I- LA CHAÎNE TROPHIQUE ANAEROBIE.

" Amongst heterotrophs it is as anaerobes that bacteria specially excel.... It is in the use of hydrogen acceptors that bacteria are specially developed as compared with animals and plants." (Stephenson 1947).

I.A. Concept de la coopération : LA SYNTROPHIE

Les différentes fonctions métaboliques des microorganismes anaérobies sont, comme souligné précédemment, sous la dépendance d'une large gamme de processus coopératifs. La syntrophie est un cas particulier de coopération symbiotique entre deux types métaboliques, qui dépendent l'un de l'autre, pour la dégradation de certains substrats, en transférant un ou plusieurs intermédiaires métaboliques entre les microorganismes partenaires. L'exemple typique, illustrant la syntrophie, est celui de la culture de *Methanobacillus omelianskii* (**Barker 1940**) qui a secondairement été montré comme étant une coculture de deux organismes partenaires : la souche S et la souche M. o. H (**Bryant et al. 1967**). Ces deux souches coopèrent pour la conversion de l'éthanol en acétate et méthane par un transfert interspécifique d'hydrogène (Figure S. 31). La croissance des bactéries fermentatives S est conditionnée par la présence d'un partenaire hydrogénotrophe (M.o.H) permettant de rendre la réaction exergonique*. Aucun des deux partenaires ne peut se développer seul et la dégradation de l'éthanol est dépendante de la coopération entre ces deux souches, la première réaction ne pouvant se réaliser que si la pression partielle en hydrogène est inférieure à 10^{-3} atm.

Au sein de la chaîne trophique anaérobie, l'hydrogène moléculaire joue ainsi un rôle métabolique clé. Son élimination conditionne de nombreux processus métaboliques et impose dans de nombreux cas une syntrophie obligatoire entre les organismes hydrogénogènes et hydrogénotrophes.

I.B. Flux de carbone et d'électrons entre les différents types trophiques.

Dans les environnements anaérobies naturels complexes, la dégradation de la MO se réalise en plusieurs étapes (Figure S. 32): dans un premier temps, les polymères (polysaccharides, protéines, acides nucléiques, lipides) sont convertis en oligo- et monomères (sucres, acides aminés, acides gras, glycérol, purines, pyrimidines) grâce aux enzymes hydrolytiques extracellulaires produites par les bactéries hydrolytiques (ou bactéries fermentatives primaires). Dans un second temps, ces espèces et les bactéries fermentatives fermentent ces monomères en

* Réaction exergonique : Une réaction est spontanée à température et à pression constantes quand l'énergie libre du système diminue pendant la réaction ou en d'autres termes quand ΔG est négatif

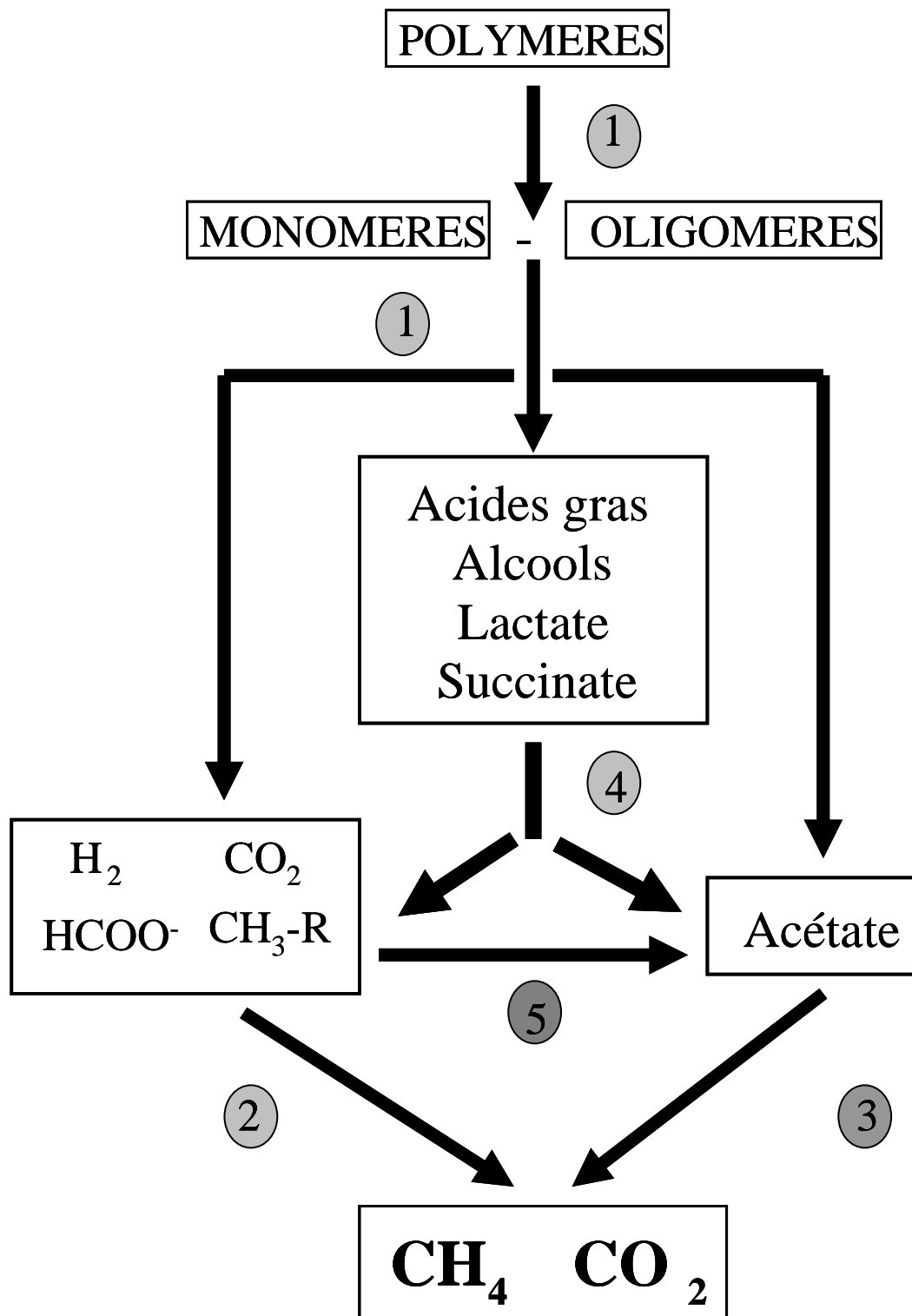


Figure S. 32: Flux de carbone et d'énergie dans la dégradation de la matière organique. Groupes de procaryotes impliqués : 1-Fermentatives primaires, 2- méthanogènes (ou autres hydrogénotrophes), 3- méthanogènes acétoclastes, 4- Fermentatives réductrices de protons (fermentatives secondaires), 5- Bactéries homoacétogènes.

acides gras volatils à courtes chaînes carbonées (acétate, propionate, butyrate, valérate, isovalérate, *etc.*), alcools, composés aromatiques, *etc.* Certains de ces métabolites (acétate, H_2 , CO_2 , ou autres composés mono carbonés) sont directement assimilables dans différents processus respiratoires microbiens (sulfato-réduction, méthanogénèse, dénitrification, réduction dissimilatrice de métaux). Les autres composés (acides gras à plus de deux atomes de C, alcools à plus de un atome de C, acides gras ramifiés et aromatiques) sont secondairement fermentés par les bactéries "réductrices obligatoires de protons" qui les convertissent en substrats assimilables par les bactéries respiratoires. Ces dernières, intervenant dans les étapes terminales de la dégradation anaérobie de la matière organique, conduisent à la formation de CH_4 , CO_2 et d'autres éléments réduits en fonction de l'accepteur final d'électrons (Fe II), H_2S , *etc.*). Cette dernière étape est dans la plupart des biotopes naturels, le siège de processus compétitifs entre les communautés hydrogénotrophes pour l'acquisition de l'hydrogène. Le résultat de ces compétitions dépend, comme nous le verrons dans les sections suivantes, de nombreux facteurs.

La chaîne trophique présentée [Figure S. 32](#) est typiquement celle se réalisant dans les écosystèmes où la méthanogénèse est dominante (ex : sédiments lacustres). Dans ces environnements, pauvres en sulfates, la conversion complète de la matière organique en méthane et CO_2 est catalysée par l'action concertée d'au moins quatre groupes métaboliques différents incluant des bactéries hydrolytiques et fermentatives, et au moins deux types d'*Archaea* méthanogènes ([Schink 1991, 1997](#)). Dans les environnements riches en sulfates (ex : écosystèmes sédimentaires marins), la dégradation de la matière organique n'implique pas nécessairement l'intervention de bactéries fermentatives de second ordre. En effet, les bactéries sulfato-réductrices présentent une plus forte versatilité physiologique que les méthanogènes et sont capables d'assimiler l'ensemble des composés carbonés issus de la fermentation primaire en les oxydant en CO_2 et en réduisant simultanément les sulfates en sulfites ([Widdel 1988](#)).

Dans les environnements anoxiques présentant des communautés hydrogénotrophes actives, maintenant de faibles pressions partielles en H_2 , les flux de carbone et d'électrons suivent les voies métaboliques externes ([Figure S. 32](#)) et les intermédiaires fermentaires réduits jouent un rôle mineur. La voie centrale n'est cependant jamais nulle car les acides gras à longues chaînes et les acides gras ramifiés sont systématiquement produits dans les processus de fermentation des lipides et des acides aminés. La fonction des bactéries homoacétogènes ([groupe 5, Figure S. 32](#)) dans le processus global est plus spéculative, elles apparaissent connecter le pool des composés monocarbonés et de l'hydrogène avec celui de l'acétate. De part leur versatilité métabolique, elles peuvent également participer à la fermentation des sucres et à la dégradation de composés spécifiques comme les composés N-méthylés ou les phénols méthoxylés ([Schink 1994](#)).

Reaction	$p\epsilon^\circ$ ($\equiv \log K$)	$p\epsilon^\circ$ (pH) ^b
(1) $\frac{1}{4}\text{O}_2(\text{g}) + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+20.75	+13.75
(2) $\frac{1}{5}\text{NO}_3^- + \frac{9}{10}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{10}\text{N}_2(\text{g}) + \frac{3}{5}\text{H}_2\text{O}$	+21.05	+12.65
(3) $\frac{1}{2}\text{MnO}_2(\text{s}) + \frac{1}{2}\text{HCO}_3^-(10^{-3}) + \frac{3}{2}\text{H}^+ + \text{e}$ $= \frac{1}{2}\text{MnCO}_3(\text{s}) + \text{H}_2\text{O}$	—	+8.9 ^c
(4) $\frac{1}{2}\text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{NO}_2^- + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+14.15	+7.15
(5) $\frac{1}{8}\text{NO}_3^- + \frac{3}{8}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{8}\text{NH}_4^+ + \frac{3}{8}\text{H}_2\text{O}$	+14.90	+6.15
(6) $\frac{1}{6}\text{NO}_2^- + \frac{1}{3}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{6}\text{NH}_4^+ + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+15.14	+5.82
(7) $\frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{CH}_4(\text{g}) + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+9.88	+2.88
(8) $\frac{1}{4}\text{CH}_2\text{O} + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{4}\text{CH}_4(\text{g}) + \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$	+6.94	-0.06
(9) $\text{FeOOH}(\text{s}) + \text{HCO}_3^-(10^{-3}) + 2\text{H}^+ + \text{e}$ $= \text{FeCO}_3(\text{s}) + 2\text{H}_2\text{O}$	—	-0.8 ^c
(10) $\frac{1}{2}\text{CH}_2\text{O} + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH}$	+3.99	-3.01
(11) $\frac{1}{6}\text{SO}_4^{2-} + \frac{3}{2}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{6}\text{S}(\text{s}) + \frac{3}{2}\text{H}_2\text{O}$	+6.03	-3.30
(12) $\frac{1}{8}\text{SO}_4^{2-} + \frac{3}{8}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{8}\text{H}_2\text{S}(\text{g}) + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+5.25	-3.50
(13) $\frac{1}{8}\text{SO}_4^{2-} + \frac{3}{8}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{8}\text{HS}^- + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+4.25	-3.75
(14) $\frac{1}{2}\text{S}(\text{s}) + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{H}_2\text{S}(\text{g})$	+2.89	-4.11
(15) $\frac{1}{3}\text{CO}_2(\text{g}) + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{3}\text{CH}_4(\text{g}) + \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$	+2.87	-4.13
(16) $\frac{1}{6}\text{N}_2(\text{g}) + \frac{3}{2}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{3}\text{NH}_4^+$	+4.68	-4.68
(17) $\frac{1}{2}(\text{NADP}^+) + \frac{1}{2}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}(\text{NADPH})$	-2.0	-5.5 ^d
(18) $\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{H}_2(\text{g})$	0.0	-7.00
(19) Oxidized ferredoxin + e = reduced ferredoxin	-7.1	-7.1 ^d
(20) $\frac{1}{2}\text{CO}_2(\text{g}) + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{24}(\text{glucose}) + \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$	-0.20	-7.20 ^d
(21) $\frac{1}{2}\text{HCOO}^- + \frac{3}{2}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	+2.82	-7.68
(22) $\frac{1}{2}\text{CO}_2(\text{g}) + \text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{4}\text{CH}_2\text{O} + \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$	-1.20	-8.20
(23) $\frac{1}{2}\text{CO}_2(\text{g}) + \frac{1}{2}\text{H}^+ + \text{e} = \frac{1}{2}\text{HCOO}^-$	-4.83	-8.33

Tableau S. 9 : Constantes d'équilibre des processus prédominants dans les écosystèmes aquatiques anaérobies. Ces constantes sont définies à 25°C, d'après Stumm et Morgan 1981. $p_e =$ activité des électrons $= E_H \cdot F / (2.3RT)$, E_H : potentiel redox (volts), F : Constante de Faraday (96,490 C.mol⁻¹), R : Constante des gaz, T : température (K)

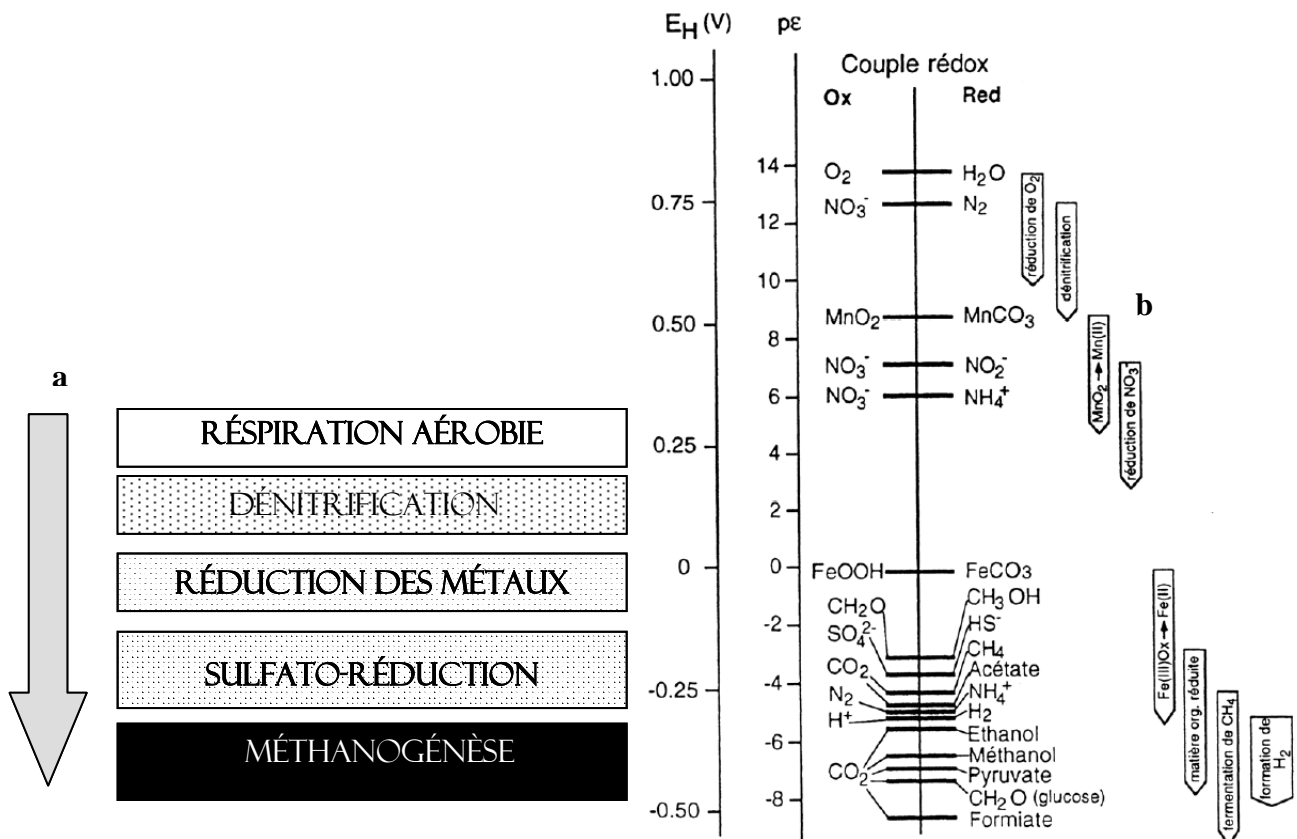


Figure S. 33 : a- Séquences théoriques des réactions redox dans des écosystèmes sédimentaires marins, b- diagramme des énergies libres.

I.C. Compétitions entre communautés hydrogénotrophes.

I.C.1. Aspects énergétiques : Energie libre et séquences de réactions redox.

Dans les environnements anoxiques, l'utilisation d'une variété d'accepteurs d'électrons alternatifs à l'oxygène influe sur les cycles biogéochimiques de nombreux éléments inorganiques. Les éléments participant aux processus redox prédominants sont : le carbone, l'hydrogène, l'azote, l'oxygène, le soufre, le fer, et le manganèse. Le Tableau S. 9 présente les constantes d'équilibre des couples redox les plus fréquemment rencontrés et l'échelle droite du diagramme de la Figure S. 33 liste les séquences des réactions redox calculées, à pH7, depuis les plus forts réducteurs aux plus forts oxydants. L'énergie libre issue des réactions d'oxydoréductions (exprimée en Kilojoules par mole d'électrons transférés) peut être visualisée sur le diagramme de la Figure S. 33. b [$\Delta G = 2,3RT (p_{\epsilon 2} - p_{\epsilon 1})$]. Les constantes d'équilibre (Tableau S. 9) ou le diagramme de l'énergie libre (Figure S. 33 b) peuvent ainsi être utilisés pour prédire quelles réactions sont thermodynamiquement possibles (par exemple, à pH 7, les nitrates (NO_3^-) peuvent oxyder HS^- en SO_4^{2-} , une réaction connue pour être catalysée par *Thiobacillus denitrificans*). Ces considérations thermodynamiques suggèrent d'autre part que le processus énergétiquement le plus favorable va intervenir le premier et conditionner différentes séquences redox (Figure S. 33 a). Un réducteur comme le carbone organique (ex : CH_2O) peut ainsi être dégradé, en premier, par son oxydation avec l' O_2 , l'appauvrissement en O_2 conduisant à l'utilisation successive de NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , et CO_2 comme accepteurs finaux d'électrons. Ces séquences sont dans certaines limites une description réaliste de la nature et peuvent ajouter, comme dans les écosystèmes sédimentaires, une dimension spatiale aux considérations d'équilibre (Figure S. 33b). Néanmoins de nombreux autres facteurs comme les facteurs cinétiques et les couplages syntrophiques sont également nécessaires à la réalisation spontanée de certaines réactions.

I.C.2. Autres facteurs influençant les compétitions : facteurs liés à la physiologie des espèces microbiennes.

Les caractéristiques intrinsèques de chaque microorganisme vont conditionner sa survie, sa croissance, son abondance, l'ensemble des interactions qu'il peut établir avec les autres formes vivantes et son environnement abiotique et donc son influence sur les différents cycles biogéochimiques. Cette section n'est absolument pas exhaustive des facteurs liés à la physiologie des microorganismes, une simple énumération de facteurs potentiellement important sera établie.

- Le taux de croissance : En présence de nutriments en excès (rarement le cas de façon durable dans les écosystèmes naturels), les microorganismes peuvent croître à leur taux de croissance maximum. Dans ce cas, les bactéries présentant un taux de croissance élevé se développent rapidement. Le taux maximum de croissance, variable d'une espèce bactérienne à l'autre, dépend de différents paramètres comme la source énergétique, le pH, la concentration en source azotée, le transfert à travers les membranes, *etc.*
- Utilisation préférentielle de substrats : L'utilisation préférentielle de substrat par une espèce bactérienne lui permet de sélectionner le substrat lui assurant la croissance la plus efficace tout en limitant la synthèse enzymatique (répression catabolique). Ce phénomène permet de comprendre la diversité des écosystèmes, il explique pourquoi au sein d'un écosystème cohabitent plusieurs espèces capables d'occuper des niches écologiques similaires sans pourtant être en compétition nutritionnelle l'une avec l'autre.
- Affinité pour le substrat : Lorsque la disponibilité en nutriments devient faible ou limitante, les bactéries ne peuvent croître à leur taux maximum de croissance, l'affinité pour le substrat devient alors un déterminant majeur de la croissance et des compétitions entre espèces.
- Besoins énergétiques : Les microorganismes ont besoin d'énergie (ATP) pour croître, et pour assurer leur intégrité cellulaire (énergie d'entretien ou de maintenance). Lorsque le taux de croissance est élevé, la proportion de l'énergie nécessaire à l'entretien est faible, mais lorsque le taux de croissance diminue (par exemple en situation de carence nutritionnelle), cette proportion augmente et peut dans certains cas représenter la totalité de l'énergie utilisée. Ainsi, dans certaines situations, un découplage énergétique, c'est à dire une fermentation sans croissance, est observé. Dans ce cas l'énergie produite est entièrement réutilisée pour assurer le maintien de l'intégrité cellulaire. Cette énergie de maintenance est très variable selon les espèces microbiennes, en conditions de limitations de substrat, les espèces présentant des besoins en énergie d'entretien plus faible sont favorisées et peuvent ainsi devenir prédominantes dans l'écosystème (**Russell 2002**).
- Rendements énergétiques : L'efficacité de l'utilisation de l'ATP pour la croissance bactérienne n'est pas constante, mais varie d'une espèce à l'autre.
- Résistance à différents facteurs environnementaux : comme par exemple le pH, les métaux lourds, les antibiotiques, les xénobiotiques, *etc.*
- Adhésion aux substrats et la capacité à former des biofilms : Le phénomène d'adhésion, qui permet aux bactéries de coloniser un habitat et de s'y maintenir, procure aux espèces qui ont la capacité d'adhérer, un avantage écologique certain. En effet, les cellules bactériennes sont directement en contact avec leur substrat ce qui évite la diffusion des enzymes dans le milieu

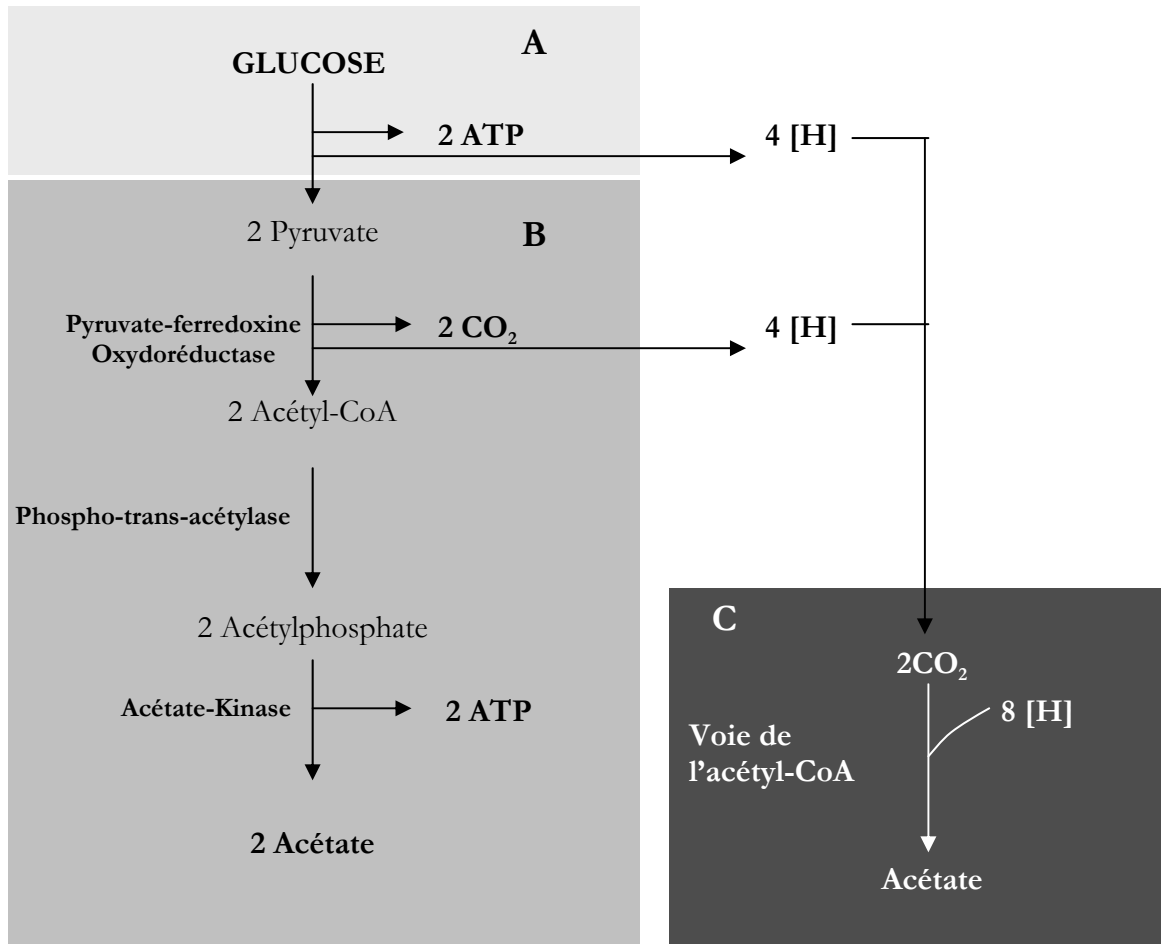


Figure S. 34: Conversion homoacétogénique du glucose en acétate. Le glucose est converti en 2 molécules de pyruvate *via* la glycolyse (A) qui libère de l'ATP par la phosphorylation du substrat. Le pyruvate est ensuite oxydé et décarboxylé, conduisant à la formation d'acétyl-CoA, de CO₂, et d'équivalents réduits (B). Les deux acétyl-CoA qui sont produits à partir du pyruvate sont convertis en deux molécules d'acétate, ce processus fournissant de l'ATP par phosphorylation du substrat. Les 8 équivalents réduits produits *via* la glycolyse et la pyruvate-ferredoxine oxydoréductase sont utilisés dans la voie de l'Acétyl-CoA pour réduire deux molécules de CO₂ en une molécule additionnelle d'acétate (C). Le CO₂ est issu de l'environnement et de la décarboxylation du pyruvate. D'après Drake *et al.* (2002).

extérieur. D'autre part les biofilms constitue un micro habitat privilégié pour les microorganismes, facilitant les couplages syntrophiques, et les échanges de métabolites.

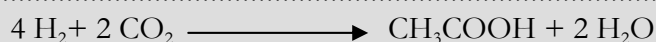
- Autres facteurs : De nombreux autres paramètres tels que la mobilité, la réponse aux gradients de concentrations des paramètres physico-chimiques (**Alexandre et al. 2003**), la distance entre les cellules, la résistance au jeûne, les systèmes de régénération ou de stockage de l'énergie, les mutations au cours de la phase stationnaire, (**Kivisaar 2003**), le Quorum Sensing (**Mitsumori et al. 2003**) sont connus pour déterminer la croissance et le développement mais aussi dans certains cas la survie des microorganismes dans les écosystèmes complexes.

II- PROCESSUS METABOLIQUES ANAEROBIES CLASSIQUEMENT DEFINIS

Cette section sera principalement dévolue aux processus respiratoires intervenant dans les étapes terminales de la dégradation anaérobie de la matière organique (sulfato-réduction, réduction dissimilatrice du Fe (III), *etc.*). Cependant, en raison du rôle central de l'acétate au sein de la chaîne trophique anaérobie, le processus d'acétogénèse sera également abordé.

II.A. L'acétogénèse

L'observation de microorganismes catalysant la réduction du CO₂-H₂ dépendante pour former de l'acétate a conduit à la première description du processus d'acétogénèse (**Fischer et al. 1932**). Le microbiologiste allemand, Wieringa, isola quelques années après la première bactérie acétogène, *Clostridium acetikum* (**Wieringa 1936, 1939-1940, 1941**), capable de croître *via* la réaction suivante :



Suite à ces découvertes, les recherches conduites sur les acétogènes sont restées très sporadiques, se résumant à l'étude de **Karlsson et al. (1948)**, et, aucune publication n'est parue jusqu'au nouvel isolement de *C. acetikum* en 1980-1981 (**Adamse et Velzeboer 1982, Braun et al. 1981, Gottschalk et Braun 1981**). Le nombre d'espèces acétogènes connues s'est considérablement accru ces vingt dernières années, et actuellement une centaine d'espèces ont été isolées d'environnements très divers. Ces bactéries peuvent ainsi être rencontrées dans la plupart des environnements anaérobies, incluant les environnements extrêmes (exemple : *Acetobacterium psammolithicum*, **Krumholz et al. 1999**), et, si la majorité des isolats actuels sont mésophiles, certaines espèces sont thermophiles ou psychrotolérantes.

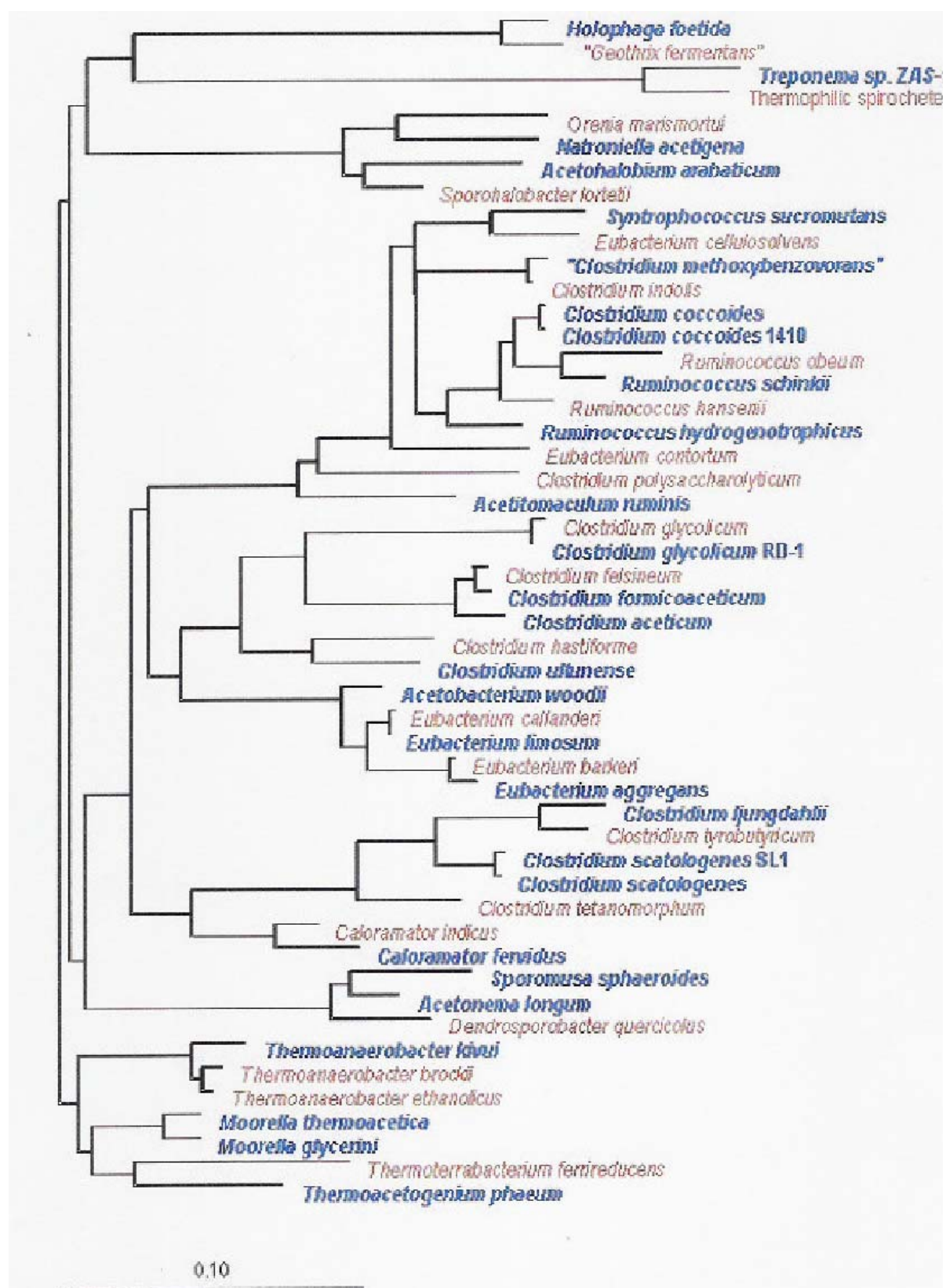


Figure S. 35: Arbre phylogénétique représentant des bactéries acétogènes (en bleu) et leurs espèces affiliées non acétogènes. D'après Drake *et al.* 2006

II.A. 1. Définition des acétogènes et de l'acétogénèse

Le processus d'acétogénèse a uniquement été décrit chez des organismes appartenant au domaine des *Eubacteria* et si l'acétogénèse est souvent perçue comme un processus fermentatif, l'utilisation du CO₂ comme accepteur final d'électrons, implique une forte dissimilarité avec les fermentations classiques. Ces procaryotes utilisent la voie de réduction de composés monocarbonés pour la synthèse de l'acétyl-CoA[†], un précurseur métabolique d'acétate et de biomasse. Cette voie conduisant à la fixation de CO₂ a été dénommée "la voie de l'Acétyl-CoA" (Figure S. 34) mais est souvent dénommée "la voie de Wood-Ljungdahl", en référence aux deux biochimistes G. Wood et L. G. Ljungdahl qui en ont élucidé les principaux processus enzymatiques à partir du modèle *Clostridium thermoaceticum* (reclassifié *Moorella thermoacetica*, **Collins et al. 1994**).

Les voies métaboliques par lesquelles l'acétate est formé au cours des croissances aérobies ou anaérobies de microorganismes variés peuvent être fondamentalement différentes. Par exemple, le mécanisme par lequel l'acétate est formé *via* l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter aceti* est fondamentalement différent de celui utilisé par certaines bactéries anaérobies strictes synthétisant l'acétate à partir du CO₂ *via* la voie réductive de l'Acétyl-CoA. Ces différences ont conduit à l'établissement de la nomenclature suivante : le terme acétogénèse est utilisé pour décrire le processus par lequel les organismes produisent de l'acétate, sans implication obligatoire de la voie de l'Acétyl-CoA, le terme homoacétogène distingue les microorganismes utilisant la voie de l'Acétyl-CoA (**Schink et Bomar 1992**).

II.A.2. Taxonomie et phylogénie des acétogènes

Bien que l'utilisation de la voie de l'Acétyl-CoA unifie les acétogènes, ces dernières sont génétiquement très diverses, et ne sont pas réunies au sein d'un même phylum. La plupart sont cependant affiliées au phylum des *Firmicutes* (Figure S.39) au sein duquel elles sont présentes dans 8 des 19 groupes de *Clostridium* (**Collins et al. 1994, Zhilina et al. 1998, Stackebrandt et al. 1999**). D'autre part, si les genres *Acetobacterium*, *Sporomusa* et *Moorella* sont exclusivement composés d'acétogènes, la plupart des acétogènes sont phylogénétiquement proches d'espèces non acétogènes (Figure S. 35).

[†] Acétyl- Coenzyme A

II.A.3 : Impact global, écologie et perspectives évolutives

Au cours des cinquante années qui ont suivi la découverte des acétogènes en 1930, la microbiologie et l'écologie de ces microorganismes ont suscité peu d'intérêt, et les recherches sur ce groupe métabolique se sont essentiellement focalisées sur la caractérisation biochimique de la voie de l'acétyl-CoA. A partir des années 1980, il est devenu évident les acétogènes étaient un groupe cosmopolite, phylogénétiquement diversifié et que l'acétogénèse jouait un rôle déterminant dans l'environnement (elle est notamment associée à des processus respiratoires comme la méthanogénèse ou la sulfato-réduction). Un certain nombre de considérations peuvent ainsi être énoncées :

- L'acétate est un lien trophique essentiel au cours de la minéralisation de la matière organique dans de nombreux habitats anaérobies (**McInerney et Bryant 1981**).

- Au total 10^{13} kg d'acétate sont formés annuellement (dont au moins 10% *via* la voie de l'acétyl-CoA) et métabolisés secondairement dans les sols et les sédiments (**Wood et Ljungdahl 1991**)

- Plus de 25% du carbone organique total est minéralisé *via* l'acétate en conditions mésophiles et anoxiques (l'équivalent de 40 g d'acétate par kg de sol (poids sec), **Küsel et Drake 1999**). L'acétate est le composé organique dominant dans les sols (**Tani et al. 1993**), et les concentrations peuvent atteindre plusieurs mM après un événement pluvieux (**Küsel et Drake 1999**). Si l'on considère que le poids du premier mètre de sol sur l'ensemble de la surface terrestre est de 10^{17} kg (surface de 10^{14} m² (**Whitman et al. 1998**) et poids moyen de 10^3 kg. m³) et sur la base d'une concentration en acétate de 0.1 mmol.kg⁻¹; il peut être estimé q'en permanence 10^{12} kg d'acétate est présent dans le premier mètre de la surface terrestre. Même si un faible pourcentage de cet acétate est issu de l'acétogénèse, l'amplitude de ce processus métabolique est énorme.

- La voie de l'acétyl-CoA (ou une voie relative) a pu constituer le premier processus de fixation autotrophique du CO₂ (**Lindahl et Chang 2001**). En effet, les méthanogènes (ou leurs ancêtres !) qui sont probablement les premiers organismes autotrophes (**Schopf et al. 1983, Brock 1989**) utilisent une voie acétyl-CoA synthase-dépendante très similaire à la voie de Wood-Ljungdahl.

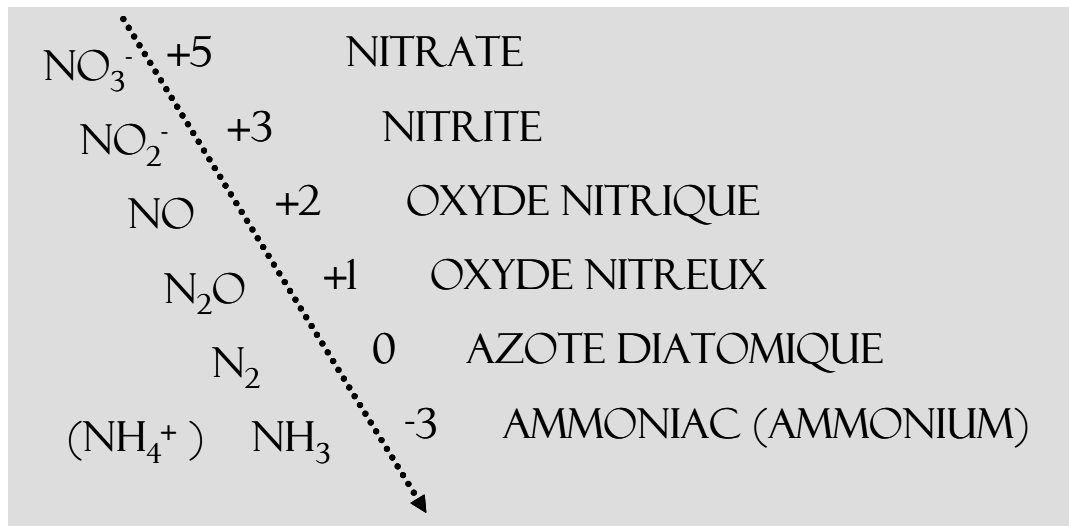
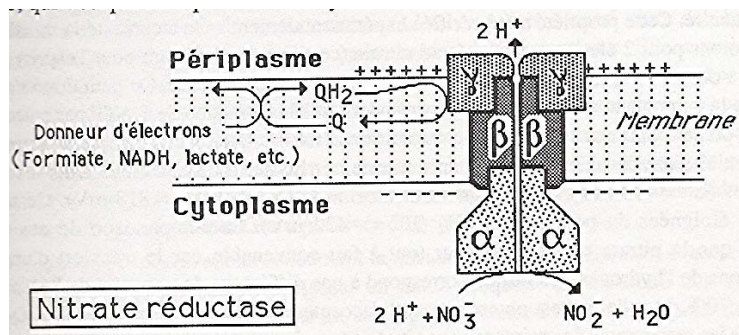


Figure S.36: Les différents niveaux d'oxydation de l'azote

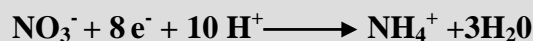


La réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase constitue l'étape clé de la chaîne de réactions. La localisation de ces nitrates réductases dissimilatrices est en général membranaire mais certaines peuvent également être localisée dans le péripasme et sont reliées à la chaîne respiratoire par l'intermédiaire du cytochrome c.

Figure S. 37 : Schéma de la structure de la nitrate réductase (d'après Pelmont 1992)

II.B. Les bactéries dénitrifiantes et la dénitrification.

L'azote, disponible dans la nature à différents degrés d'oxydation (Figure S. 36), ne peut entrer dans le métabolisme que sous sa forme ammoniacale. Ainsi, l'utilisation du nitrate comme source azoté ne peut se faire que par une cascade de réductions correspondant au bilan suivant :



La réduction du nitrate participe à deux opérations bien distinctes. Dans la première, le nitrate est réduit en ammonium et est utilisé comme source d'azote. Cette voie assimilatrice permet l'incorporation de l'ammonium principalement par le système de la glutamine synthétase et de la glutamate synthase (GOGAT). Le principe du deuxième mode d'utilisation correspond à la voie dissimilatrice pour laquelle le nitrate est utilisé comme accepteur d'électrons en anaérobiose. La dénitrification au sens strict du terme correspond à la réduction des nitrates en nitrites (*via* la nitrate réductase, Figure S. 37) qui intervient le plus souvent lui même comme accepteur respiratoire et se trouve réduit à son tour en composés gazeux tels que le NO, le N₂O, le N₂. Une seconde voie de réduction des nitrates, l'ammonification dissimilatrice, conduit à la formation d'ammonium qui n'est pas forcément assimilé par le microorganisme (surtout si le milieu contient déjà une source azotée comme des acides aminés).

La dénitrification est une fonction largement répandue dans le domaine des *Bacteria* et n'est pas l'apanage d'un groupe monophylétique. Cette large distribution est notamment la résultante de transferts latéraux de gènes (Stewart 1988, Zumft 1992). Certaines *Archaea* sont également capables de réaliser ce processus (Zumft 1992, 1997), ainsi que les mitochondries de certains champignons (Kobayashi *et al.* 1996). Cependant, si la NO réductase du champignon *Fusarium oxysporum* a été cristallisée et sa structure décrite (Park *et al.* 1997), l'importance écologique de la dénitrification par ces microorganismes nécessite une caractérisation plus poussée. La croissance anaérobie de certaines espèces utilisant les nitrites ou le N₂O comme accepteurs d'électrons a également été reportée (Bothe *et al.* 2000).

La contribution des microorganismes dans le cycle biogéochimique de l'azote est essentielle, et, l'importance écologique de la dénitrification est reflétée par le nombre de publications ayant trait à ce processus : dénitrification dans les sols et les sédiments (Revsbech et Sorensen 1990), facteurs contrôlant la dénitrification (Ferguson 1998), dessin de sondes pour l'analyse phylogénétique ou fonctionnelle des gènes de la dénitrification (Ward 1996), biologie cellulaire et moléculaire de la dénitrification (Zumft 1997), nitrate réductases dissimilatrices chez les bactéries (Phillipot et Hojberg 1999), *etc.* L'acquisition de connaissances substantielles

<i>Enzyme</i>	<i>Reaction performed</i>	<i>Genes</i>	<i>Prosthetic group</i>	<i>Function of gene product</i>	<i>Gene size (bp)</i>
NO₃⁻ reductase	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	<i>narG</i>	[4Fe, 4S] molybdopterin	Catalytic center	3588 3786
		<i>narH</i>	3[4Fe 4S]+[3Fe 4S]	Confers e- from NarI to NarG	1464 1677
		<i>narJ</i>		unknown	526 741
		<i>narI</i>	2 cyt <i>b</i>	Membrane anchor	672 741
Heme NO₂⁻ reductase	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	<i>nirS</i>	Cyt cd1/subunit (α_2)	QH ₂ oxidation Catalytic center	1665 1791
Cu NO₂⁻ reductase	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	<i>nirK</i>	Cu(I), Cu(II)(α_2)	Catalytic center	1092 1140
NO reductase	$2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	<i>norB</i>	Cyt <i>b</i>	Catalytic center	1341 1542
		<i>norC</i>	Cyt <i>c</i>	Catalytic center	441 453
N₂O reductase	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	<i>norZ</i>	4 Cu/subunit (α_2)	Catalytic center	1905 1959

Tableau S. 10 : Les enzymes de la dénitrification, D'après Bothe *et al.* 2000

sur la physiologie, la biochimie et les mécanismes de régulation moléculaire des bactéries dénitrifiantes a permis le développement d'outils moléculaires pour les études environnementales. Ces approches moléculaires sur l'écologie des bactéries dénitrifiantes sont essentiellement basées sur les gènes de fonction et leurs produits. Les gènes impliqués dans la dénitrification (*nar*, *nor*, *nirS*, *nirK* et *nos*, Tableau S. 10) présentent en effet des régions très conservées pouvant être exploitées pour le dessin et le développement de sondes et des amorces. La plupart des études ont été conduites sur la nitrite réductase (**Braker et al. 2000, Michotey et al. 2000**) qui est présente soit sous forme d'un cytochrome *cd1* (Cd1 NIR) codé par *nirS* ou d'une enzyme-Cu (Cu-NIR) codé par *nirK*. La distribution et la diversité des bactéries dénitrifiantes dans des sédiments marins ont également été étudiées à l'aide d'amorces spécifiques de la N₂O réductase (NosZ) (**Scala et Kerkhof 1998, 1999, 2000**).

II.B. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et la sulfato-réduction.

La production d'H₂S à partir du sulfate dans les environnements aquatiques a été reconnue comme un processus biologique en 1864 par Meyer, qui supposait que la réaction était réalisée par certaines algues. Ce n'est qu'en 1895 que l'isolation d'une BSR par Beijerinck démontre clairement l'implication d'un groupe procaryotique dans le processus de sulfato-réduction. Depuis, notre vision sur ces organismes a considérablement évolué. Les BSR sont désormais étudiées en référence à des problèmes clés de taxonomie et de phylogénie, d'écophysiologie et de biochimie, de stratégies bioénergétiques, de métabolisme du carbone et du soufre, de biologie moléculaire et d'écologie microbienne (**Lehours et Fonty 2004**).

Les BSR constituent un groupe très hétérogène d'espèces dont certaines sont affiliées aux Eubactéries, d'autres aux *Archaea*. La caractéristique commune de ce groupe fonctionnel est de posséder le gène codant pour la sulfite-réductase, enzyme clé du processus de réduction dissimilatrice des sulfates ($2\text{CH}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{S}$). La classification des BSR est basée sur de nombreuses propriétés: morphologie (bacilles, vibrio, coques, spirilles, filaments...), motilité, %GC (Guanine-Cytosine) dans l'ADN, présence ou non de désulfovamine et de cytochromes, température optimale de croissance et capacité à oxyder complètement ou incomplètement l'acétate. Cependant, cette classification phénotypique ne reflète pas nécessairement les relations phylogénétiques entre les différentes espèces révélées par l'analyse des gènes ADNr16S (**Widdel 1988**).

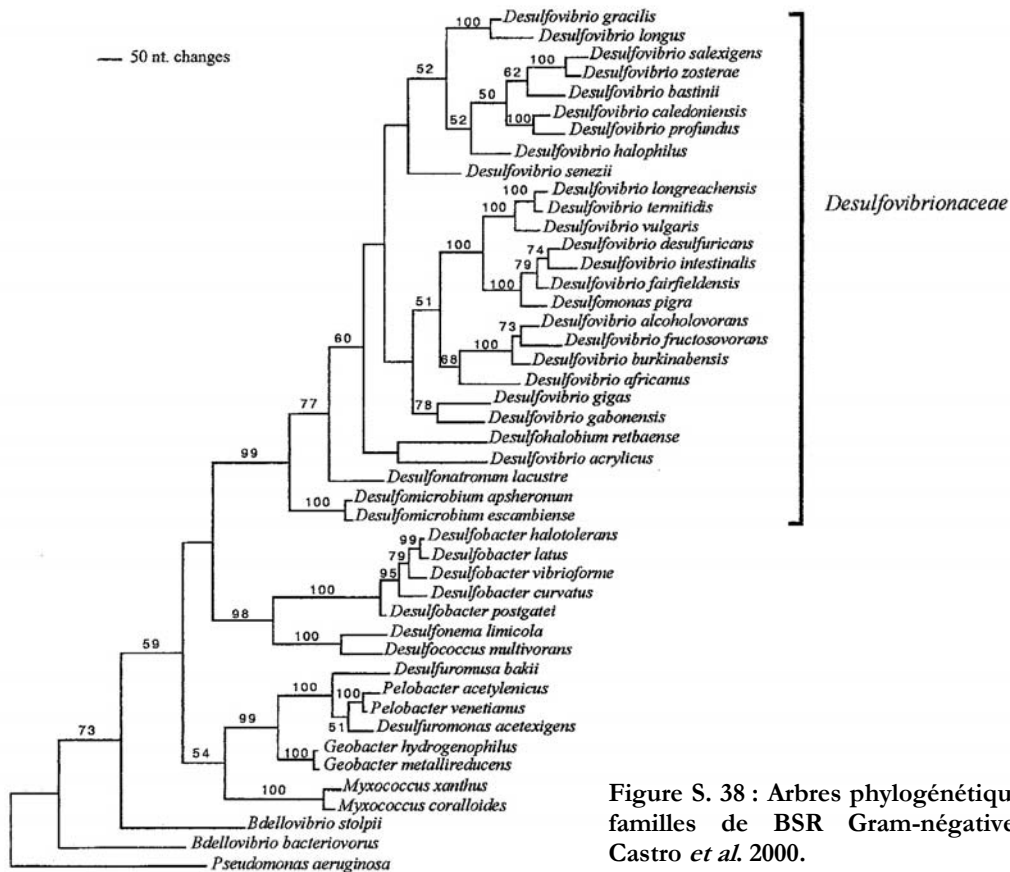
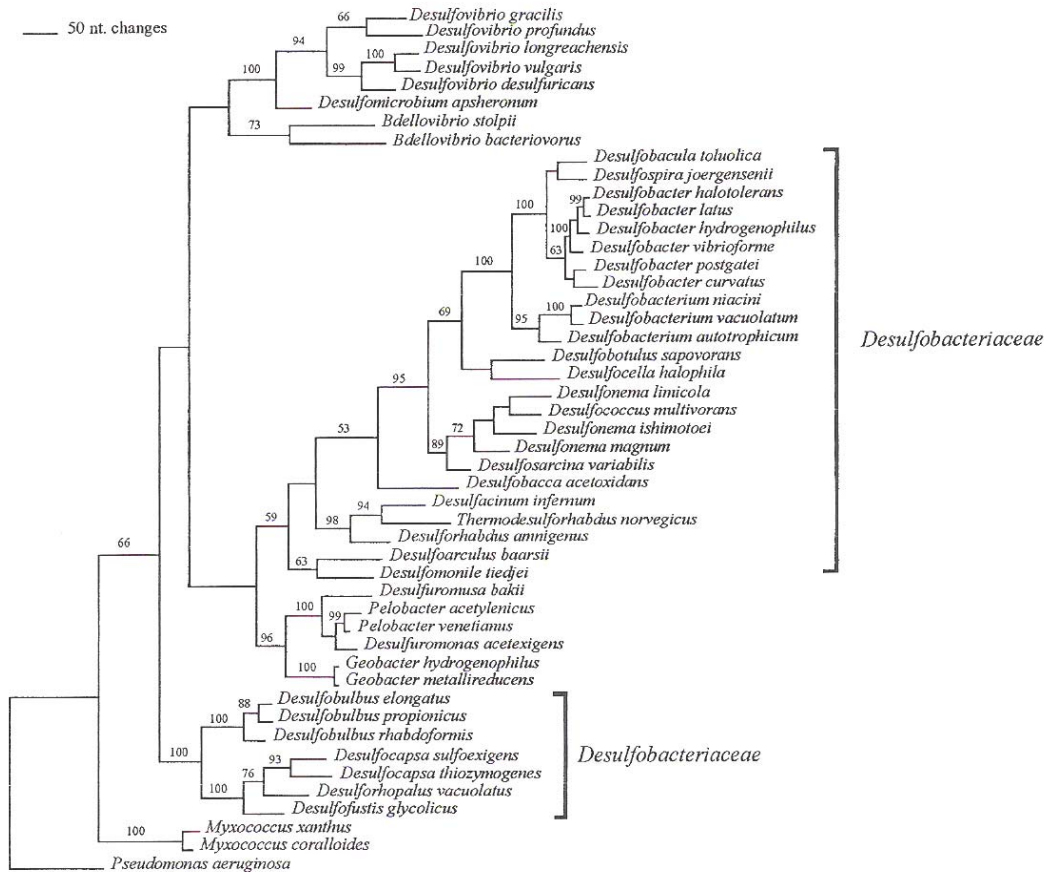


Figure S. 38 : Arbres phylogénétiques des deux familles de BSR Gram-négatives. D'après Castro *et al.* 2000.



II.B.1. Phylogénie des bactéries sulfato-réductrices

Sur la base de l'analyse des séquences ARNr16S, les différentes espèces de BSR peuvent être séparées en 4 groupes : les BSR mésophiles Gram-négatives, les BSR Gram-positives formant des spores, les BSR thermophiles et les *Archaea* thermophiles sulfato-réductrices.

■ **BSR MESOPHILES GRAM-NEGATIVES** (Figure S. 38): Ce groupe de BSR est affilié à la sub-division *delta* des *Proteobacteria*, pour lesquelles deux familles ont été proposé : les *Desulfobacteriaceae* (incluant les genres *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfobotulus*, et *Desulfoarculus*) et les *Desulfovibrionaceae* (incluant les genres *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium*).

■ **BSR GRAM-POSITIVES FORMANT DES SPORES** (Figure S. 39a): Ce groupe, dominé par le genre *Desulfotomaculum*, appartient aux Gram-positives à faible % G+C (*Firmicutes*), qui comprend également les genres *Bacillus* et *Clostridium*. Ces BSR sont connues pour former des spores thermorésistantes et peuvent être thermophiles. Cependant leurs optima de température sont plus bas que ceux des BSR thermophiles Gram-négatives et des *Archaea* sulfato-réductrices. Les différentes espèces du genre *Desulfotomaculum* sont métaboliquement versatiles et peuvent utiliser une large gamme de donneurs d'électrons pour leur croissance (acétate, aniline, succinate, catéchol, indole, éthanol, phénol, acétone, stéarate...). La capacité de certaines espèces à utiliser le Fer (III) comme seul accepteur terminal d'électrons a été décrit pour certaines BSR Gram-positives comme *Desulfotomaculum reducens* (Tebo et Obratzsova 1998). Les BSR Gram-positives sont rencontrés dans des environnements similaires à ceux des BSR de la sub-division *delta-Proteobacteria*, et la formation de spores permet à ce groupe de survivre à de longues périodes de dessiccation ou à des conditions oxydées. *Desulfotomaculum* est ainsi le genre prévalent dans les rizières en raison de l'alternance de périodes oxydées et anoxiques (Widdel 1992).

■ **BSR THERMOPHILES** (Figure S.39b): Les deux espèces caractéristiques de ce groupe sont *Thermodesulfobacterium commune* (Zeikus et al. 1983) et *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (Henry et al. 1994). Ces deux genres utilisent l'hydrogène moléculaire (H₂) comme accepteur d'électrons si de l'acétate est présent (Castro et al. 2000). Ces genres présentent des optimums de température entre 65 et 70°C mais peuvent survivre à des températures plus faibles (Nilsen et al. 1996).

a

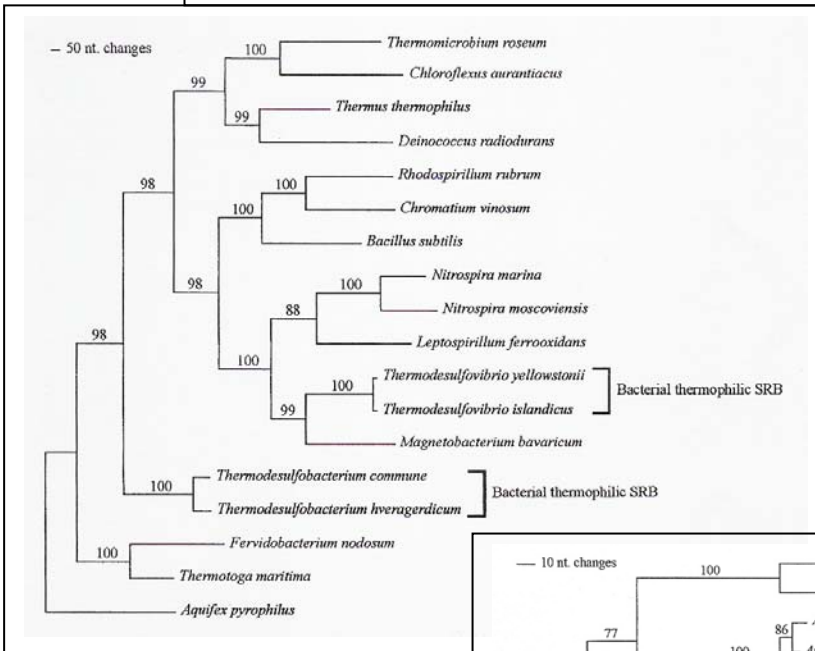
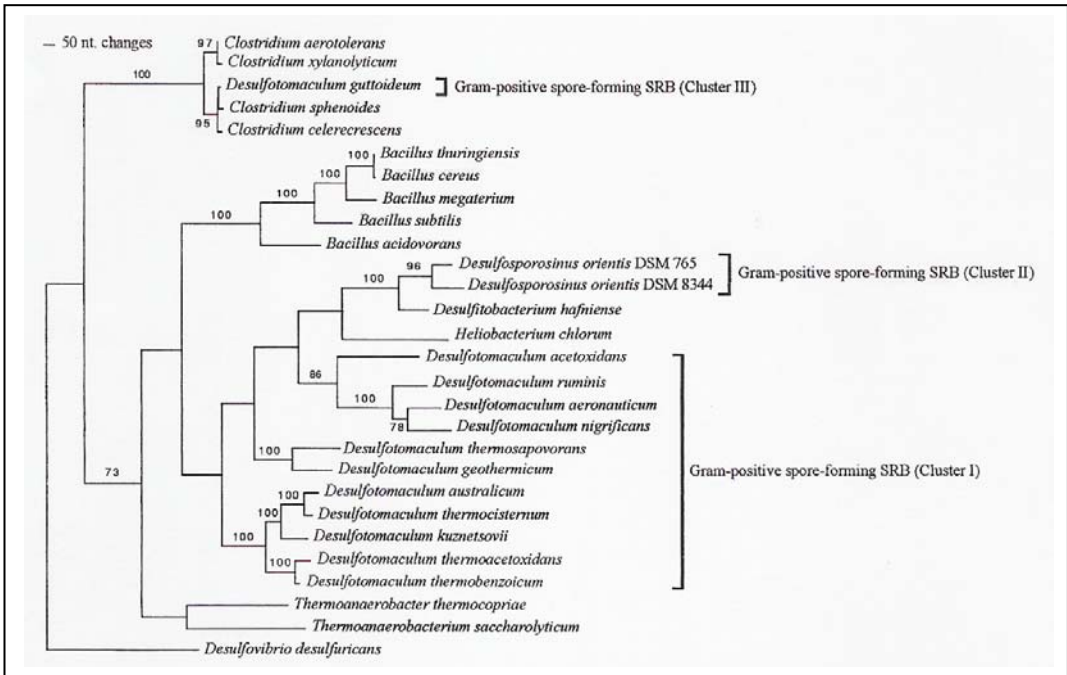
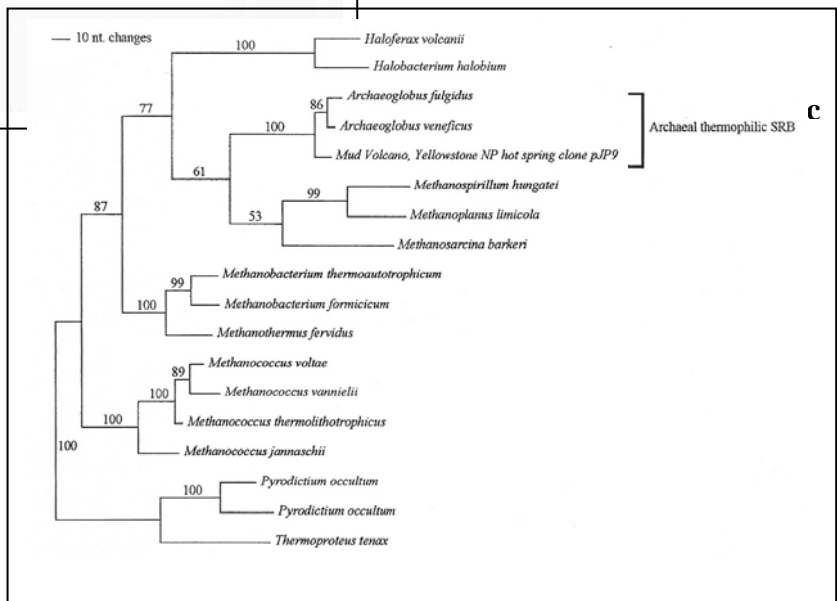


Figure S. 39: Arbres phylogénétiques des BSR Gram-positives (a), des BSR Gram-négatives thermophiles (b) et des *Archaea* sulfato-réductrices (c). D'après Castro *et al.* (2000).



■ ARCHAEA THERMOPHILES SULFATO-REDUCTRICES (Figure S. 39c) : Ce groupe de BSR exhibe des optimums de température au dessus de 80°C, et seulement deux espèces, isolées de systèmes hydrothermaux marins, ont été décrites : *Archaeoglobus fulgidus* (Stetter 1988) et *Archaeoglobus profundus* (Burggraf et al. 1990). *A. fulgidus* possède un flagelle, est chemolithoautotrophe facultative et produit de faibles quantités de méthane, alors que *A. profundus* ne possède pas de flagelle, est chemolithoautotrophe obligatoire et ne produit pas de méthane. Le processus d'acquisition de la capacité de sulfato-réduction au sein du genre *Archaeoglobus* reste inconnu. Wagner et al. 1998 ont proposé que l'ancêtre commun des *Archaea* et des *Bacteria* possédait l'enzyme clé (sulfite-réductase) ou que ce gène a été transféré latéralement vers *Archaeoglobus* à partir d'une *Eubacteria* après la divergence des deux domaines.

Si les BSR sont actuellement divisées en 4 groupes phylogénétiques majeurs, la découverte de nouvelles divisions ne peut être exclue, notamment à partir d'environnements extrêmes. Ainsi, Jorgensen et al. 1992 ont observé une activité de sulfato-réduction dans les sédiments du bassin Guaymas dans des gammes de température comprises entre 100 et 110°C, températures pour lesquelles aucune BSR n'a encore été isolée.

II.B.2. Ecologie des bactéries sulfato-réductrices.

Les BSR sont rencontrées dans des écosystèmes anaérobies très divers [écosystèmes aquatiques (marins ou lacustres ; sédimentaires ou pélagiques), sols, écosystèmes digestifs (colon humain, rumen)] et leurs niches écologiques sont variées. Ces espèces se développent dans des gammes de température comprises entre les psychrophiles et les thermophiles, et pour des concentrations en NaCl s'étendant de l'eau douce aux conditions hypersalines. Dans les environnements aquatiques, les BSR les plus fréquemment décrites (*Desulfovibrionaceae* (*Desulfovibrio*), *Desulfobacteriaceae* (*Desulfobacter*, *Desulfobulbus*)) appartiennent au groupe des mésophiles Gram-négatives de la subdivision *delta* des *Proteobacteria* (Devereux et al. 1992).

En dépit de la taille restreinte de leur génome, ceux de *Desulfovibrio gigas* et *D. vulgaris* représentent seulement 40% du génome d'*E.Coli*, les BSR sont des organismes très particuliers. L'évolution récente de nos connaissances de ces organismes réside notamment dans la mise en évidence de potentialités écologiques jusqu'ici insoupçonnées. Longtemps considérées comme inféodées à un spectre restreint de substrats, il apparaît désormais que le nombre de composés oxydables par les différentes espèces caractérisées de BSR est d'environ 125 (Rabus et al. 2000). Outre leur implication biogéochimique dans le cycle du soufre et leur rôle clé dans le processus de dégradation anaérobie de la MO, les BSR présentent un intérêt considérable dans des processus

de bioremédiation comme, par exemple, l'élimination de sulfates ou de métaux lourds des eaux usées. Certaines BSR présentent notamment la capacité de dégrader des composés aromatiques (benzène, naphthalène, phénanthrène), divers composés xénobiotiques (**Weiner et Lovley 1998, Stahl et al. 2002**), et d'oxyder des composés aromatiques hydrocarbonés polycycliques (**Coates et al. 1996**). D'autres activités sont importantes pour l'environnement comme les déhalogénations réductives ou la production de méthyl-mercure (**Fauque 1995, Barton et Tomei 1995**). L'implication de certaines espèces dans la réduction de l'ion ferrique (FeIII) en ion ferreux (FeII), des formes solubles d'uranium (U[VI]) en uranium insoluble (U[IV]) et dans la formation de sidérite (carbonate de fer) a également été observée (**Hansen 1994**).

L'étude de la distribution spatiale des BSR dans des écosystèmes lacustres (pélagiques ou sédimentaires) fait apparaître un spectre d'habitats également plus large qu'initialement envisagé et révèle leur présence en zone oxydée (**Hasting et Emerson 1988, Lehours et al. 2005**). Ceci souligne leur adaptabilité et leur capacité à répondre aux fluctuations des contraintes environnementales. Dans les environnements naturels, l'exposition des microorganismes anaérobies à l'O₂ est fréquent en raison de la fluctuation des interfaces zone oxydée et zone anoxique. La caractérisation du comportement des BSR vis à vis de l'O₂, qui revêt un intérêt écologique et biochimique particulier, a mis en évidence plusieurs stratégies possibles de tolérance et de survie : utilisation de l'O₂ comme accepteur d'électrons, conservation de l'énergie et protection des cellules contre les effets nuisibles, formation d'agrégats. La capacité des BSR à utiliser directement l'O₂ comme accepteur d'électrons pour oxyder l'H₂ et à réaliser ainsi une translocation significative des protons a été montré sur des cellules en suspension de *Desulfovibrio* (**Le Gall et Xavier, 1996**).

L'amplitude des potentialités écologiques des BSR, visiblement non restreintes à un type d'activité, rend difficile et complexe la détermination de la fonction et du rôle spécifique des différentes espèces dans les écosystèmes naturels. En effet, l'implication des BSR dans les cycles biogéochimiques n'apparaît pas limitée au carbone ou au soufre et la compréhension de leurs rôles dans les transferts de matière ou d'énergie dans les écosystèmes est très incomplète.

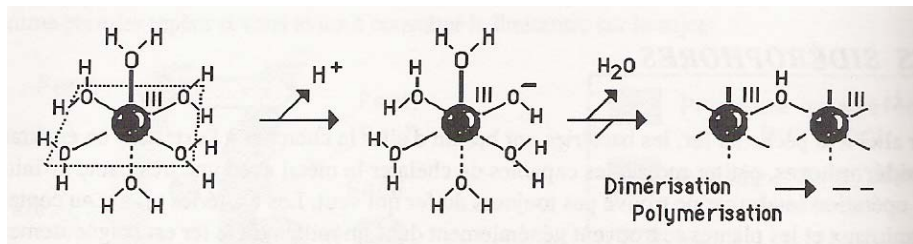


Figure S. 40: Formation d'une hydroxyde de fer insoluble : Le métal s'entoure de 6 molécules d'eau. Le départ d'un proton correspond à un pKa de l'ordre de 3, donc rapide à pH neutre et encore plus rapide si le pH s'élève. La base conjuguée formée se lie à un autre complexe formant un dimère, qui perd à son tour un autre proton et ainsi de suite, formant des précipités d'hydroxydes métalliques contenant des milliers d'atomes de fer. Ainsi, les amas d'hydroxyde de fer se forment en emprisonnant des molécules d'eau et leur organisation varie entre une organisation cristalline et un état amorphe.

II.C. Les bactéries réduisant le fer (BFR) et la réduction dissimilatrice du fer.

Le Fer, quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, représente environ 5,1% de la masse de cette dernière (Straub *et al.* 2001). Ce composé très réactif peut, en fonction des conditions environnementales, former des composés stables bivalents (FeII) ou trivalents (FeIII) (Schwertmann et Fitzpatrick 1992). Le fer ferreux (FeII), forment des minéraux comme la sidérite, la vivianite ou des sulfures de fer en conditions acides ou neutres. En présence d'oxygène le Fe (II) est stable en conditions acides et rapidement oxydé en fer ferrique Fe(III) à pH neutre (Schwertmann et Fitzpatrick 1992). Le Fe (III) forment des minéraux largement répandus dans les habitats oxydés et anoxiques. Actuellement, 16 différentes formes d'oxydes, d'hydroxydes (Figure S. 40) ou d'oxydes hydroxydes de Fe (III) sont connues et sont la plupart du temps collectivement référencées comme "oxydes de fer" (Schwertmann et Fitzpatrick 1992, Cornell et Schwertmann 1996).

Dans les environnements anoxiques, certaines espèces d'*Archaea* et de *Bacteria* présentent la capacité de transférer les électrons au Fe(III) (ou au Mn(IV)) externe sans l'assimiler (réduction dissimilatrice). Ce processus dont l'importance écologique n'est admise que depuis une dizaine d'années (Thamdrup 2000, Nealson et Saffarini 1994, Lovley 1997a), joue un rôle primordial au sein des cycles redox et constitue dans de nombreux écosystèmes anaérobies une des principales voies de dégradation de la matière organique.

II.C.1. La réduction dissimilatrice du fer : une forme primitive de respiration ?

Il apparaît que les *Bacteria* et les *Archaea* présentant un ancrage précoce au sein de l'arbre phylogénétique des procaryotes peuvent oxyder l'hydrogène *via* la réduction du Fe (III), et que la majorité de ces microorganismes peuvent conserver l'énergie issue de ce métabolisme pour leur croissance (ex : *Thermotoga maritima*, Lovley 2003). Ainsi, l'apparente conservation de la capacité de réduction du fer au sein de ces lignées profondément ancrées, suggère que l'ancêtre commun était un microorganisme oxydant l'hydrogène et réduisant le fer (Lovley 2003). Cette hypothèse basée sur des évidences biologiques (Vargas *et al.* 1998), est en accord avec les scénarios géologiques. Ces derniers révèlent en effet, la présence de grandes quantités de Fe(III) (Cairns-Smith *et al.* 1992, De Duve 1995) et de teneurs élevées en hydrogène (Walker 1980) sur la terre prébiotique. L'ensemble de ces observations suggère ainsi que la réduction dissimilatrice du Fe(III) a pu constituer une des formes pionnières de respiration et ainsi le premier mécanisme significatif d'oxydation de la MO (Walker 1987, Lovley 1991).

Organisme	Donneur d'électrons	Formes de Fe (III)	Référence
<i>Actinomucor repens</i>	Glucose	Hématite	Ottow et von Klopotek 1969
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Glucose-Asparagine	Hématite	Ottow 1970
<i>Aerobacter sp.</i>	Glucose	PCIO ¹	Bromfield 1954
<i>Alternaria tenuis</i>	Glucose	Hématite	Ottow et von Klopotek 1969
<i>Bacillus cereus</i>	Glucose-Asparagine	Hématite	Ottow 1970
<i>Bacillus mesentericus</i>	Sucrose	Ferro-manganese ore	Troshanov 1968
<i>Bacillus circulans</i>	Sucrose	PCIO	Bromfield 1954
	Glucose-Asparagine	Hématite	Ottow 1970
	Sucrose	Ferro-manganese ore	Troshanov 1968
<i>Bacillus polymyxa</i>	Glucose	PCIO	Roberts 1947
	Glucose	Hématite	Hammann et Ottow 1974
	Sucrose	PCIO	Bromfield 1954
<i>Bacillus pumilus</i>	Glucose-asparagine	Hématite	Ottow 1970
<i>Bacillus sp.</i>	Glucose	Limonite, goethite, hematite	De Castro et Ehrlich 1970
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucose	Hématite	Ottow et Glathe 1971
<i>Bacteroides hypermegas</i>	Glucose-Tryptone	Fe(III)-Cl ₃ ¹	Jones <i>et al.</i> 1984
<i>Clostridium butyricum</i>	Glucose	Hématite	Hammann et Ottow 1974
<i>Clostridium polymyxa</i>	Sucrose	Ferro-manganese ore	Troshanov 1968
<i>Clostridium saccarobutyricum</i>	Glucose	Hématite	Hammann et Ottow 1974
<i>Clostridium sporogenes</i>	Glucose, peptone	PCIO	Starkey et Halvorson 1927
<i>Escherichia coli</i>	Glucose, peptone	PCIO	Starkey et Halvorson 1927
	Glucose, Asparagine	Hématite	Ottow 1970
<i>Fusarium oxysporum</i>	Glucose	Hématite	Ottow et von Klopotek 1969
	Glucose	Citrate d'ammonium ferrique	Gunner et Alexander 1964
<i>Fusarium solani</i>	Glucose	Hématite	Ottow et von Klopotek 1969
<i>Paracolobactrum sp.</i>	Glucose	PCIO	Bromfield 1954
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose-Asparagine	Hématite	Ottow 1970
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Glucose	Fe(III)-Cl ₃	Jones <i>et al.</i> 1984
<i>Pseudomonas liquefaciens</i>	Sucrose	Ferro-manganese ore	Troshanov 1968
<i>Pseudomonas (plusieurs especes)</i>	Glucose-Asparagine	Hématite	Ottow et Glathe 1971
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Malate	Fe(III)-NTA ¹	Dobbin <i>et al.</i> 1996
<i>Serratia marcescens</i>	Glucose-Asparagine	Hématite	Ottow 1970
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Soufre élémentaire	Fe(III)-Cl ₃	Brock et Gustafson 1976
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Soufre élémentaire	Fe(III)-Cl ₃	Brock et Gustafson 1976, Kino et Usami 1982
<i>Vibrio sp.</i>	Glucose	Fe(III)-Cl ₃	Jones <i>et al.</i> 1983
<i>Vibrio sp.</i>	Malate, pyruvate	Fe(III)-Cl ₃	Jones <i>et al.</i> 1984
<i>Wolinella succinogenes</i>	Formate	Fe(III)-Cl ₃	Lovley <i>et al.</i> 1998

Tableau S.11 : Organismes fermenteurs capables de réduire le Fe(III) mais non connu pour conserver de l'énergie de cette réduction dissimilatrice.

Organisme	Donneur d'électrons	Formes de Fe(III)	Référence
Bactéries sulfato-réductrices			
<i>Desulfobacter postgatei</i>	Acétate	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	H ₂	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Propionate	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfovibrio baarsii</i>	Butyrate, caproate, Octanoate	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Lactate	Fe(III)-Cl ₃	Jones <i>et al.</i> 1984, Coleman <i>et al.</i> 1993
<i>Desulfovibrio baculatus</i>	Lactate	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i>	Lactate	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Lactate	Fe(III)-NTA	Lovley <i>et al.</i> 1993a
<i>Desulfomaculum nigrificans</i>	Lactate	Fe(III)-Cl ₃	Jones <i>et al.</i> 1984
Archaea			
<i>Archeoglobus fulgidus</i>	H ₂	Fe(III)-citrate	Vargas <i>et al.</i> 1998
<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	H ₂	Fe(III)-NTA	Vargas <i>et al.</i> 1998
<i>Methanopyrus kandleri</i>	H ₂	Fe(III)-citrate	Vargas <i>et al.</i> 1998
<i>Pyrococcus furiosus</i>	H ₂	Fe(III)-citrate	Vargas <i>et al.</i> 1998
<i>Pyrodictium abyssi</i>	H ₂	Fe(III)-citrate	Vargas <i>et al.</i> 1998

Tableau S.12 : Bactéries sulfato-réductrices et *Archaea* capables de réduire le Fe(III) mais non connu pour conserver de l'énergie de cette réduction dissimilatrice.

II.C.1. Les microorganismes réalisant la réduction dissimilatrice du Fe(III) (BFR).

Les microorganismes catalysant la réduction dissimilatrice du Fe(III) peuvent être séparés en deux groupes : ceux conservant l'énergie du transfert d'électron au Fe(III) [ou au Mn(IV)] et ceux ne présentant pas cette capacité.

A- Microorganismes ne conservant pas l'énergie de la réduction du Fe(III).

■ **LES BACTERIES FERMENTATIVES** : La plupart des microorganismes qui croît *via* un métabolisme fermentaire peuvent utiliser le Fe (III) comme accepteur minoritaire d'électrons au cours de la fermentation (Tableau S.11). Il est néanmoins admis que moins de 5% de ces équivalents réduits sont transférés au Fe(III), la majorité des équivalents réduits étant retrouvés dans les produits de fermentation (Lovley 1987, 2003, Lovley et Phillips 1988). Les considérations thermodynamiques suggèrent cependant que la fermentation couplée à la réduction du Fe(III) est énergétiquement plus favorable que la fermentation seule.

■ **LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES** (Tableau S.12): Certaines bactéries sulfato-réductrices appartenant à la sub-division *delta*- des *Proteobacteria* (Coleman *et al.* 1993, Lovley *et al.* 1993b), sont également capables de catalyser la réduction dissimilatrice du Fe(III). Les donneurs d'électrons impliqués étant les mêmes que ceux utilisés pour la sulfato-réduction (Lovley 2003). Le cytochrome c₃, transporteur intermédiaire d'électrons de la chaîne membranaire des BSR, peut jouer le rôle d'une Fe(III)-réductase (Lovley *et al.* 1993b). En dépit d'une plus forte affinité pour l'hydrogène, et probablement pour d'autres accepteurs d'électrons, lorsque le Fe(III) est l'accepteur final d'électrons, aucune de ces BSR n'apparaît pouvoir croître avec Fe(III) comme seul accepteur d'électrons (Lovley *et al.* 1993b, Coleman *et al.* 1993). L'avantage des BSR à réduire le Fe(III), si il y en a un, a été peu étudié. Lovley *et al.* (1993a) ont proposé que la réduction du Fe(III) par les BSR pourrait constituer une stratégie compétitive conduisant à une déplétion en Fe(III) et créant ainsi des conditions plus favorables à la sulfato-réduction.

Par opposition aux BSR de la sub-division *delta*- des *Proteobacteria* ne pouvant croître sur Fe (III) comme seul accepteur d'électrons, il a été suggéré que *Desulfotomaculum reducens* (BSR Gram positive) peut produire de l'énergie pour sa croissance *via* la réduction de Fe(III), Mn(IV), U(VI), et Cr(VI) (Tebo et Obratzsova 1998).

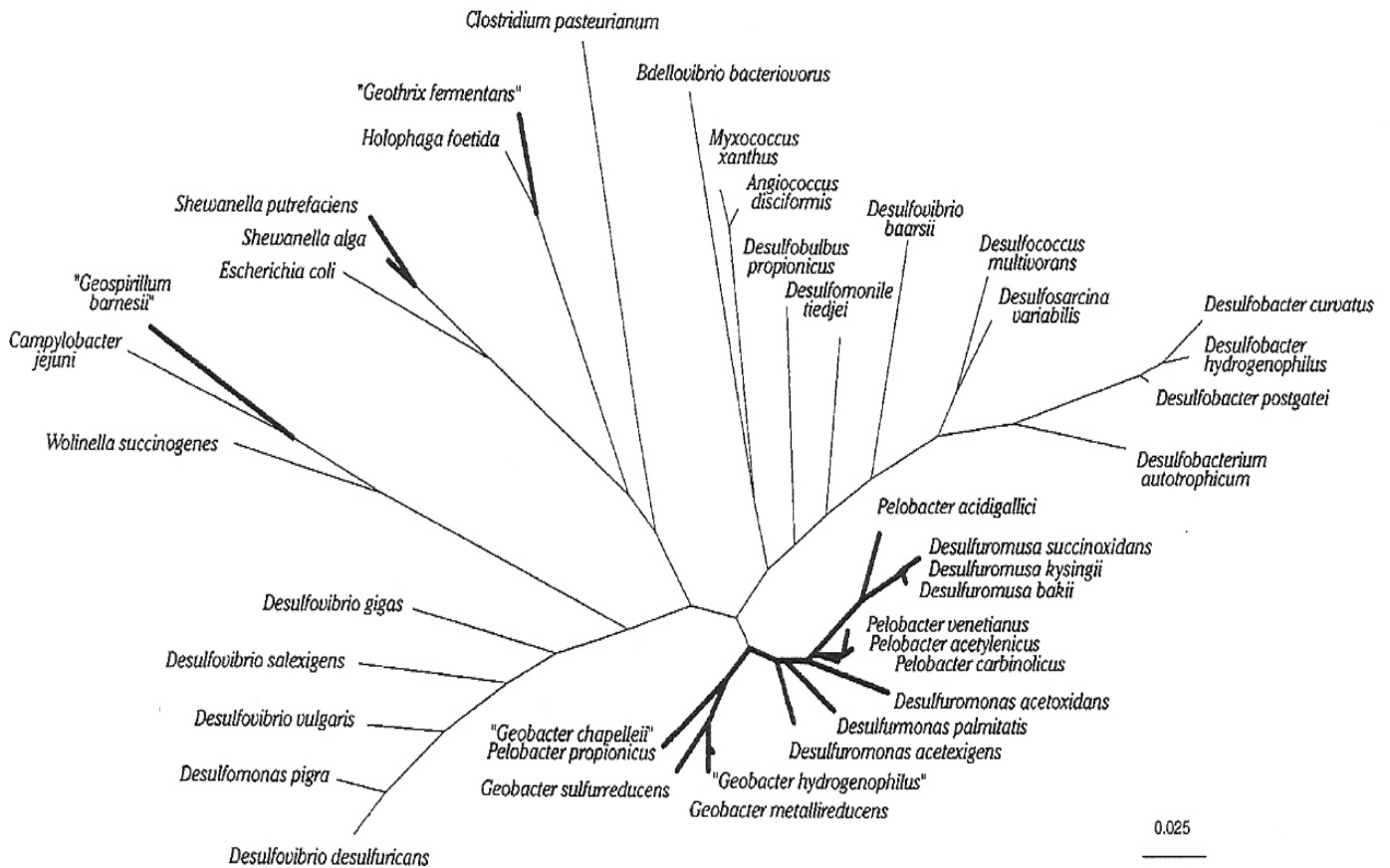


Figure S. 41: Arbre phylogénétique des séquences ARNr16S illustrant les principales lignées de bactéries ferro-réductrices (lignes épaisses). D'après Lonergan *et al.* 1996.

B- Microorganismes conservant l'énergie de la réduction du Fe(III).

Ces microorganismes ferro-réducteurs sont phylogénétiquement (Figure S.41) et morphologiquement très diversifiés. La plupart croissent par oxydation de substrats organiques ou d'H₂ couplée à la réduction du Fe (III) (Lovley 2003).

■ **BFR DE LA SUB-DIVISION DELTA DES PROTEOBACTERIA :** La majorité des BFR décrites sont incluses dans la famille des *Geobacteriaceae* de la sub-division *delta-Proteobacteria*. Au sein de cette famille, *Geobacter metallireducens* fut le premier microorganisme décrit réalisant l'oxydation de l'acétate en réduisant le Fe(III) (Lovley et Phillips 1988, Lovley *et al.* 1993b). Parmi les organismes isolés en culture, *G. metallireducens* est phylogénétiquement proche de *Desulfomonas acetoxidans*, une espèce marine capable de coupler l'oxydation de l'acétate avec la réduction de S⁰ (Pfenning et Bielb 1976) mais également avec la réduction dissimilatrice du Fe(III) (Roden et Lovley 1993). Depuis la découverte de ces deux espèces, de nombreux autres microorganismes apparentés à *G. metallireducens* et *D. acetoxidans* ont été isolés et décrits comme couplant l'oxydation de l'acétate avec la réduction du Fe (III) : *G. sulfurreducens* (Caccavo *et al.* 1994), *D. palmitatis* (Coates *et al.* 1995), *D. acetexigens* (Finster *et al.* 1994), et *Desulfuromusa kysingii* (Liesack et Finster 1994). *Pelobacter carbinolicus*, également phylogénétiquement proche de *D. acetoxidans* (Stackebrandt *et al.* 1989), peut croître avec H₂ ou éthanol comme seule source de carbone et Fe (III) comme seul accepteur d'électrons (Lovley *et al.* 1995b).

■ **BFR DES SUBDIVISIONS BETA ET GAMMA- DES PROTEOBACTERIA :** Parmi les organismes de la subdivision *beta-* des *Proteobacteria*, seul *Ferribacter limneticum* est connu pour conserver de l'énergie par réduction du Fe(III) (Cummings *et al.* 1999). Cependant, contrairement à beaucoup de BFR, il est incapable d'utiliser Mn(IV) comme accepteur d'électrons. En addition de ces microorganismes anaérobies stricts, plusieurs isolats, anaérobies facultatifs, affiliés à la subdivision *gamma-* des *Proteobacteria* sont capables, en conditions anaérobies, d'oxyder l'H₂ et/ou de petits acides organiques en réduisant le Fe(III) et/ou le Mn(IV). Ces microorganismes sont affiliés aux genres *Shewanella* (*S. putrefaciens* (Myers et Nealson 1988), *S. alga* (Rossello-Mora *et al.* 1995)), *Ferrimonas*, *Aeromonas* et *Pseudomonas* (souche Z-731 Balashova 1985).

■ **BFR DU PHYLUM DES ACIDOBACTERIA :** *Geothrix fermentans* présente la capacité d'oxyder des acides gras à courtes chaînes en CO₂ en utilisant le Fe(III) comme accepteur final d'électron.

■ **BFR ACIDOPHILES** : Le Fe (III) est fortement insoluble à pH neutre mais soluble à pH acide, et le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ est significativement plus élevé que celui du couple redox Fe (III)oxyde/ Fe^{2+} (Lovley 2003). En conséquence, l'oxydation de donneurs d'électrons, comme S^0 , non favorable à pH neutre, peut être particulièrement favorable en conditions acides où le Fe^{3+} est plus disponible (Lovley 2003). Ainsi, *Thiobacillus ferrooxidans* peut croître en anaérobiose par réduction du Fe(III) en utilisant S^0 comme donneur d'électrons (Pronk *et al.* 1992).

■ **BFR THERMOPHILES** : De nombreux microorganismes thermophiles et hyperthermophiles peuvent conserver de l'énergie pour leurs croissances par réduction du Fe (III). La première BFR thermophile décrite, *Bacillus infernus* (Boone *et al.* 1995), est une bactérie Gram-positive anaérobie stricte présentant un optimum de température de 60°C. Secondairement, d'autres BFR thermophiles, *Thermoterrabacterium ferrireducens* (Slobodkin *et al.* 1997), *Pyrobaculum islandicum*, *P. aerophilum* et *Thermotoga maritima* (Kashefi et Lovley 1999, Lovley 2003) ont été isolées d'environnements extrêmes.

II.C.3. Stratégies pour la réduction dissimilatrice du Fer.

Le mécanisme par lequel les BFR transfèrent les électrons aux formes insolubles de Fe(III) (ou de Mn(IV)) reste peu connu. Les premières expériences conduites par Lovley et ses collaborateurs (Lovley 1991) ont suggéré qu'un contact direct entre la cellule bactérienne et l'oxyde de Fe(III) était nécessaire. Cependant, Caccavo *et al.* (1997) ont révélé que des souches de *Shewanella alga*, déficientes dans leur capacité à s'attacher aux oxydes de Fe (III), transféraient néanmoins les électrons à cet élément.

■ **REDUCTION DISSIMILATRICE DU FER PAR CONTACT DIRECT AVEC L'OXYDE INSOLUBLE** : *Geobacter metallireducens* entre en contact direct avec la particule ferrique (Figure S. 42), à moins qu'un accepteur d'électrons soluble comme le citrate de fer soit présent dans l'environnement (Nevin et Lovley 2000). Lorsque le milieu contient des formes insolubles de Fe^{3+} ou Mn^{4+} , les cellules de *G. metallireducens* développent des flagelles et des pilis autorisant le chimiotactisme et l'attachement à la particule (Childers *et al.* 2002). En revanche, aucun appendice n'est formé si *G. metallireducens* est cultivé en présence de citrate de fer.

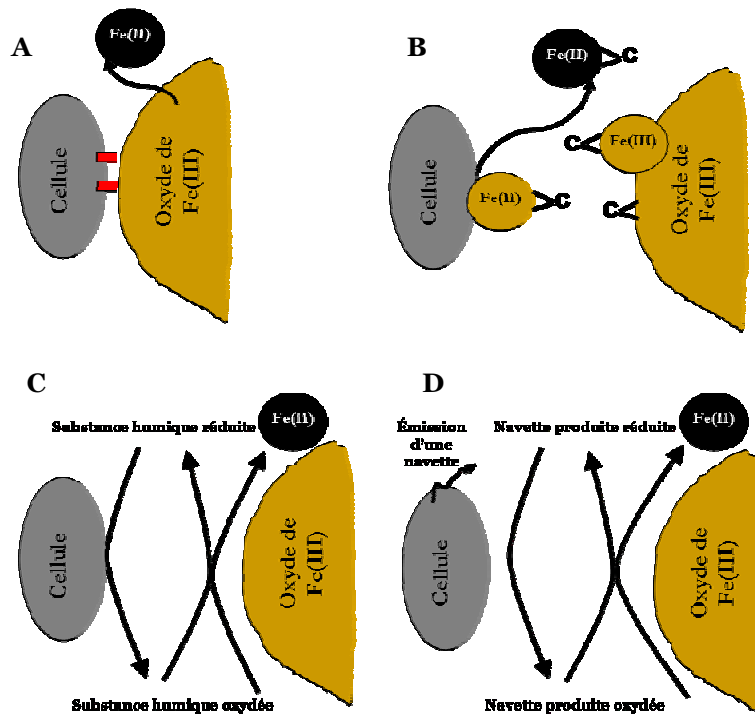


Figure S.42 : Mécanismes proposés pour la réduction dissimilatrice du Fe (III) (A) la réduction de l'oxyde de Fe (III) se réalise *via* un contact direct avec la surface du minéral. (B) La réduction du Fe (III) est réalisée après solubilisation du Fe (III) par sécrétion de chélateurs. (C) Utilisation de navettes électroniques (substances humiques) (D) Réduction du Fe (III) après excrétion par la cellule bactérienne de navettes électroniques.

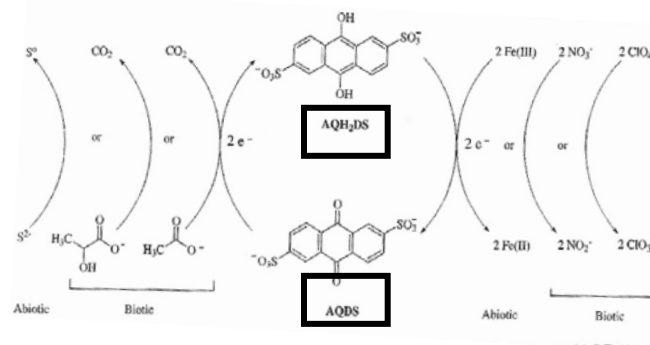


Figure S.43: Utilisation de l'anthraquinone disulfonate (AQDS), analogue des substances humiques, comme accepteur intermédiaire d'électrons pour la réduction de composés inorganiques.

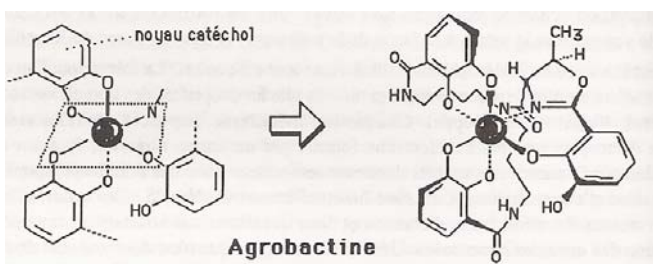


Figure S.44 : Exemple d'un sidérophore d'*Agrobacterium* (l'agrobactine). La partie gauche montre comment trois noyaux aromatiques de type catéchol s'installent autour du fer dans la ferri-agrobactine. Une molécule organique ne peut former un complexe avec le métal (chélate) que si elle peut adopter une conformation telle que les atomes donneurs soient "présentés" exactement selon la géométrie requise.

■ **REDUCTION VIA DES ACCEPTEURS INTERMEDIAIRES D'ELECTRONS** : Les substances humiques, naturellement abondantes dans de nombreux environnements, peuvent jouer le rôle d'accepteurs intermédiaires d'électrons pour la réduction des oxydes ferriques (Lovley *et al.* 1998, Lovley *et al.* 1996, Lovley *et al.* 1999, Lovley *et al.* 2000). Les hydroquinones générées par la réduction biotique des quinones (composante des substances humiques) extracellulaires peuvent transférer les électrons aux oxydes ferriques insolubles *via* une réaction strictement abiotique (Figure S. 42). Cette réduction du Fe(III) régénère les hydroquinones en quinones qui peuvent à nouveau servir d'accepteurs d'électrons pour la chaîne respiratoire bactérienne. Ce processus respiratoire, pouvant représenter une chaîne primitive de transporteur d'électrons, n'est pas spécifique du fer mais peut impliquer une variété d'autres composés environnementaux comme accepteurs finaux d'électrons (NO_3^- , ClO_4^- ...), (Schröder *et al.* 2003). De nombreuses espèces bactériennes hétérotrophes anaérobies facultatives, comme *Paracoccus denitrificans*, peuvent réduire les substances humiques ou l'analogue AQDS[‡] (Figure S. 43) en conditions anaérobies (Lovley *et al.* 1999, Lovley et Blunt-Harris 1999). Ces observations ouvrent des perspectives intéressante sur l'importance écologique de la réduction dissimilatrice du Fe(III) dans les environnements naturels par des microorganismes ne présentant pas la capacité de réduire directement le fer ferrique (Straub *et al.* 2001).

■ **PRODUCTION ET SECRETION DE "NAVETTES ELECTRONIQUE"** : La capacité de certaines bactéries à produire et sécréter de petits composés redox diffusibles pouvant servir de navettes d'électrons entre le microorganisme et l'oxyde ferrique insoluble a récemment été mise en évidence (Nevin et Lovley 2002a et b, Figure S.42).

■ **SECRETION DE CHELATEURS DU FE (III)** (Figure S. 42) : La sécrétion de composés chélateurs du fer par *S. alga* et *G. fermentans*, conduisant à une solubilisation significative des oxydes ferriques a récemment été démontrée (Nevin et Lovley 2000, 2002a). Cependant la nature de ces sidérophores n'est pas encore déterminée, de même l'implication ou non de ces chélateurs de Fe^{3+} comme accepteurs terminaux d'électrons dans le processus de réduction dissimilatrice du fer n'est pas établie. Hernandez et Newman (2001) postulent que la plupart des sidérophores ne peuvent servir d'accepteurs d'électrons en raison de leur potentiel redox négatif. Il ne peut cependant être exclu que les sidérophores impliqués dans la réduction dissimilatrice du fer présentent des propriétés structurales et chimiques différentes de celles actant dans la réduction assimilatrice (Figure S.44).

[‡] AQDS : l'anthraquinone disulfonate est un analogue de substance humique

II.C.4. Protéines impliquées dans la réduction dissimilatrice du Fe (III)

Le contact entre certaines BFR et les oxydes de Fe (III) nécessite qu'un transfert d'électrons s'établisse entre la chaîne respiratoire bactérienne et les minéraux. L'activité Fe (III)-réductase apparaît localisée au niveau membranaire chez *G. metallireducens* (Gorby et Lovley 1991), *S. putrefaciens* (Myers et Myers 1993) et *G. sulfurreducens* (Gaspard *et al.* 1998, Magnuson *et al.* 2001), et l'implication de cytochromes de type-c dans le transport des électrons vers le Fe (III) a été suggéré chez *G. metallireducens* (Lovley *et al.* 1993b) et *S. putrefaciens* (Myers et Myers 1992, 1997, Beliaev et Saffarini 1998).

Un rôle prépondérant des cytochromes de type c dans la respiration fer et leur implication potentielle comme Fe(III)-réductase (Myers et Myers 1997, 1998) ont été suggérés chez *S. oneidensis* MR-1 (Venkateswaran *et al.* 1999, Myers et Myers 1994). Ces cytochromes sont principalement localisés au niveau de l'espace périplasmique (Tsapin *et al.* 1996, Myers et Myers 1997, 2000), ou associés à la membrane (Myers et Myers 1997). En effet, plus de 50% de l'activité Fe(III)-réductase est localisée, chez *S. oneidensis*, sur la membrane externe (Myers et Myers 1993). Cette localisation originale est cependant idéale pour l'utilisation de substrats insolubles. L'implication de cytochromes de type c chez *Geobacter sulfurreducens*, a également été mise en évidence (Seeliger *et al.* 1998). Le complexe enzymatique présentant une masse moléculaire native de 300 KDa serait constitué de 5 polypeptides majeurs (Magnuson *et al.* 2000, Kaufmann et Lovley 2001) dont un cytochrome de type c de 90 KDa pouvant jouer le rôle d'une Fe(III)-réductase. Un cytochrome c de 9,6 KDa localisé au niveau de l'espace périplasmique semble intervenir dans le transfert des électrons entre l'acétate et le Fe (III) (Llyod *et al.* 2003). Une seconde réductase ferrique purifiée chez *G. sulfurreducens* est composée de deux sous unités de masse moléculaire 87 et 78 KDa, et présente une activité NADH-dépendante (Kaufman et Lovley 2001).

II.C.5. Autres capacités métaboliques des BFR

■ REDUCTION DISSIMILATRICE D'AUTRES METAUX OU METALLOÏDES : *G. metallireducens* et *S. putrefaciens* peuvent croître en utilisant l'uranium (U (IV)) ou le technétium (Tc (VII)) comme accepteurs finaux d'électrons (Lovley *et al.* 1991, Llyod et Macaskie 1996). Une variété d'autres métaux ou métalloïdes peut être réduits par les BFR, comme le Cr (VI), Se (VI), As (V) (Lovley 2003, Laverman *et al.* 1995).

■ REDUCTION DES SUBSTANCES HUMIQUES OU AUTRES QUINONES EXTRACELLULAIRES (Lovley *et al.* 1996, 1998, 2000).

■ FORMATION D'H₂ : En l'absence de Fe (III) ou d'autres accepteurs préférentiels d'électrons, certaines espèces de la famille des *Geobacteraceae* peuvent transférer des électrons aux protons pour produire l'H₂. Cette réaction nécessite d'établir un couplage syntrophique avec un microorganisme hydrogénotrophe. *G. sulfurreducens* peut ainsi oxyder l'acétate en CO₂ en coculture avec *Wollinella succinogenes* qui oxyde l'hydrogène en réduisant les nitrates (Cord-Ruwish *et al.* 1998).

■ DECHLORINATIONS REDUCTIVES : certaines BFR utilisent des composés chlorés comme accepteurs finaux d'électrons (ex : *Desulforomonas chloroethenica*, Krumholz *et al.* 1996, Krumholz 1997, Lonergan *et al.* 1996).

Les potentialités métaboliques des BFR leur confèrent ainsi un rôle primordial dans les processus de bioremédiation. Les BFR peuvent, par exemple, oxyder des composés aromatiques hydrocarbonés des aquifères contaminés (Lovley 1995, Lovley et Coates 1997, Anderson *et al.* 1998). Les minéraux Fe (II) résultants de la réduction dissimilatrice sont également des réducteurs importants pour les contaminants nitroaromatiques (Heijman *et al.* 1993, Hofstetter *et al.* 1999) ou chlorés (Fredrickson et Gorby 1996). La capacité des BFR à substituer d'autres métaux ou métalloïdes au Fe(III) dans leurs processus respiratoires peut d'autre part être exploitée pour la bioremédiation d'environnements contaminés par des métaux (Lovley et Coates 1997). Ainsi la réduction des formes solubles d'uranium (U (VI)) en uranium insoluble (U (IV)) peut permettre la précipitation de cet élément dans les environnements aquatiques.

II.D. Les *Archaea* méthanogènes et la méthanogénèse.

Les méthanogènes sont des microorganismes anaérobies stricts dont la machinerie biochimique complexe est impliquée dans la formation de méthane comme produit final de leur métabolisme. La découverte de leurs propriétés biochimiques et génétiques particulières a conduit au concept des *Archaeobacteria* à la fin des années 1970 (Woese *et al.* 1978), et à la proposition en 1990 du domaine *Archaea* (Woese *et al.* 1990). Les recherches menées sur les formes alternatives d'énergie, suite aux crises pétrolières à partir de 1973, ont révélé l'intérêt économique de ces *Archaea*. Ces études ont notamment porté sur la production de méthane dans les digesteurs anaérobies (Oremland 1988).

Gaz à effet de serre	CO ₂	CH ₄	N ₂ O	CFCs
Pouvoir relatif d'adsorption du rayonnement IR, par unité de volume, ramené à celui du CO ₂	1	32	160	16000
Contribution relative (en%) à l'effet de serre	55	15	4	19

Tableau S. 13 : Contribution du méthane au processus de réchauffement climatique en comparaison d'autres composés (D'après Dautray 1991).

Reaction	$\Delta G^{\circ'}$ (KJ/mol CH ₄)
4 H ₂ +CO ₂ →CH ₄ +2H ₂ O	−135.6
4 Formate→CH ₄ +3CO ₂ +2H ₂ O	−130.1
2 Ethanol+CO ₂ →CH ₄ +2 Acetate	−116.3
Methanol+H ₂ →CH ₄ +H ₂ O	−112.5
4 Methanol→3CH ₄ +CO ₂ +2H ₂ O	−104.9
4 Methylamine+2H ₂ O→3CH ₄ +CO ₂ +4NH ₄ ⁺	−75.0
4 Trimethylamine+6H ₂ O→9CH ₄ +3CO ₂ +4NH ₄ ⁺	−74.3
2 Dimethylsulfide+2H ₂ O→3CH ₄ +CO ₂ +H ₂ S	−73.8
2 Dimethylamine+2H ₂ O→3CH ₄ +CO ₂ +2NH ₄ ⁺	−73.2
4 2-Propanol+CO ₂ →CH ₄ +4 Acetone+2H ₂ O	−36.5
Acetate→CH ₄ +CO ₂	−31.0

Tableau S. 14 : Principales réactions et valeurs d'énergie libre standards pour la méthanogénèse D'après Whitman *et al.* 1992.

L'implication de ce gaz dans le processus de réchauffement climatique global (Tableau S.13) conduit à une constante augmentation des études sur ces microorganismes. Ainsi, de nombreuses revues sur la taxonomie, l'écologie (**Jones *et al.* 1987, Wolfe 1996**), le métabolisme (**Blaut 1994**), les voies énergétiques (**Thauer 1990, Deppenmeir *et al.* 1996**), la biochimie (**Ferry 1992, Rouvière et Wolfe 1998**) et les caractéristiques moléculaires (**Reeve 1992**) des *Archaea* méthanogènes ont été publiées.

II.D.1. Taxonomie et diversité phylogénétique des *Archaea* méthanogènes (sur la base d'espèces cultivées).

Garcia et ses collaborateurs (2000) recensent 83 espèces d'*Archaea* méthanogènes décrites pouvant être séparée dans trois principales catégories nutritionnelles :

- (a) MÉTHANOGENES HYDROGENOTROPHES (61 espèces): oxydant l'H₂ et réduisant le CO₂, parmi lesquelles, 38 espèces formatotrophes (oxydant le formate).
- (b) MÉTHANOGENES MÉTHYLOTROPHES (20 espèces) : présentant la capacité d'utiliser des composés comme le méthanol, les méthylamines ou le diméthylsulfide.
- (c) MÉTHANOGENES ACÉTOTROPHES (9 espèces) : utilisant l'acétate pour produire du méthane.

La disparité entre le nombre d'espèces de méthanogènes au sein de ces trois groupes nutritionnels peut être expliquée par les valeurs d'énergie libre (Tableau S. 14). En effet, la réaction thermodynamiquement la plus favorable est la réduction du CO₂ par l'H₂, et la moins favorable est l'oxydation acétoclastique. En conséquence, les pressions de sélection ont conduit vers l'évolution des espèces hydrogénotrophes plutôt qu'acétotrophes (**Garcia *et al.* 2000**). Néanmoins, la versatilité nutritionnelle de certaines espèces de méthanogènes ne permet pas de les placer dans une seule catégorie. Ces caractéristiques phénotypiques sont d'autre part insuffisantes pour distinguer les différents taxa, et, sur la base de différents critères phénotypiques et moléculaires, **Boone *et al.* (1993)** ont défini 5 ordres regroupant 10 familles, 26 genres et 74 espèces cultivées (Figure S. 45). Dans le cadre de cette synthèse, ne seront évoqués que trois ordres particuliers : les *Methanosarcinales* et les *Methanomicrobiales* et les *Methanobacteriales* en raison de leur prépondérance dans les écosystèmes aquatiques continentaux.

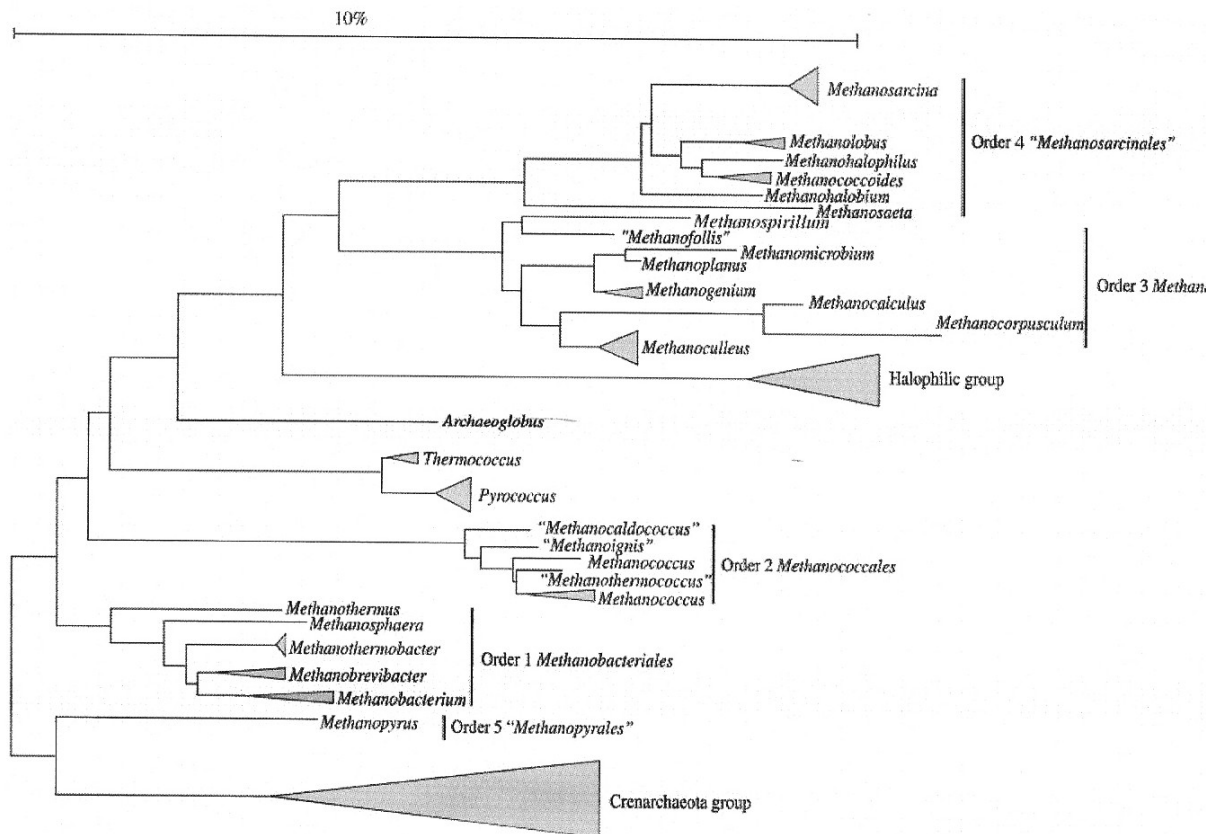


Figure S. 45: Arbre phylogénétique des Méthanogènes (domaine des *Archaea*), d'après Garcia *et al.* (2000).

■ **ORDRE DES *METHANOSARCINALES*** : regroupe les méthanogènes acétotrophes et/ou méthylotrophes en deux familles :

◆ **Famille des *Methanosarcinaceae*** dont le genre *Methanosarcina* représente les méthanogènes acétotrophes prédominantes dans les écosystèmes anaérobies où la matière organique est complètement dégradée en CO₂ et CH₄ (sédiments marins et lacustres, digesteurs anaérobies...). Certains membres de ce genre présentent une forte versatilité métabolique (ex : *Methanosarcina barkeri*) et sont capables d'utiliser H₂-CO₂, acétate et composés méthylés (méthanol, méthylamines). Les membres des 5 autres genres de la famille des *Methanosarcinaceae* (*Methanolobus*, *Methanococcoides*, *Methanohalophilus*, *Methanosalsus*, *Methanohalobium*) sont des méthanogènes méthylotrophes obligatoires.

◆ **Famille des *Methanosaetaceae*** : inclue les méthanogènes acétotrophes obligatoires regroupées dans un seul genre *Methanosaeta* dont l'espèce type est *M. concilii*.

■ **ORDRE DES *METHANOMICROBIALES*** : comprend 3 familles et 9 genres de méthanogènes hydrogénotrophes (**Rouvière et al. 1992, Boone et al. 1993**) dont les familles des *Methanomicrobiaceae* et des *Methanospirillaceae* (avec un seul genre *Methanospirillum* et une seule espèce décrite *M. hungatei*).

■ **ORDRE DES *METHANOBACTERIALES*** : comprend les familles *Methanothermaceae* et *Methanobacteriaceae*. Parmi les 13 espèces du genre *Methanobacterium*, certaines sont rencontrées dans les écosystèmes aquatiques continentaux comme *M. subterraneum* (**Kotelnikova et al. 1998**) et toutes les espèces sont capables de croître sur H₂/CO₂.

III.D.2. Ecologie et habitats naturels des méthanogènes.

La distribution des méthanogènes (espèces identifiées) dans les environnements naturels est entièrement dépendante de leurs adaptations respectives à différentes températures, pH, et salinité. La gamme de température est large, comprise entre 4 et 110°C, mais peu d'espèces ont été rapportées comme étant psychrophiles (**Franzmann et al. 1992, 1997**). Les espèces thermophiles des genres *Methanothermus* (**Stetter et al. 1981, Lauerer et al. 1986**), *Methanocaldococcus* (**Jones et al. 1983**), *Methanopyrus* (**Kurr et al. 1991**) représentent 23% des espèces connues de méthanogènes (**Garcia et al. 2000**). Confinées dans des environnements strictement anaérobies, les *Archaea* méthanogènes sont néanmoins largement distribuées dans la nature (sédiments aquatiques, sols, colonnes d'eau anoxiques, rizières, systèmes digestifs (termite, ruminants, homme, Figure S. 46), où elles occupent une position terminale dans la dégradation de la matière organique.

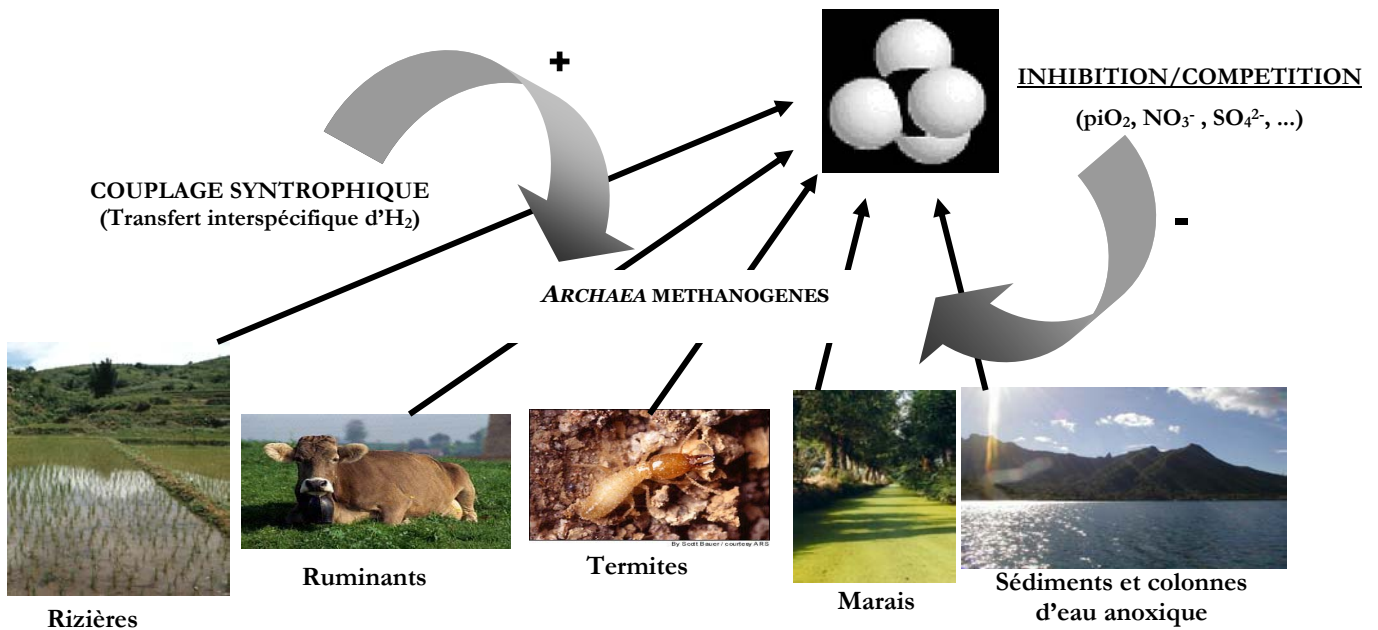
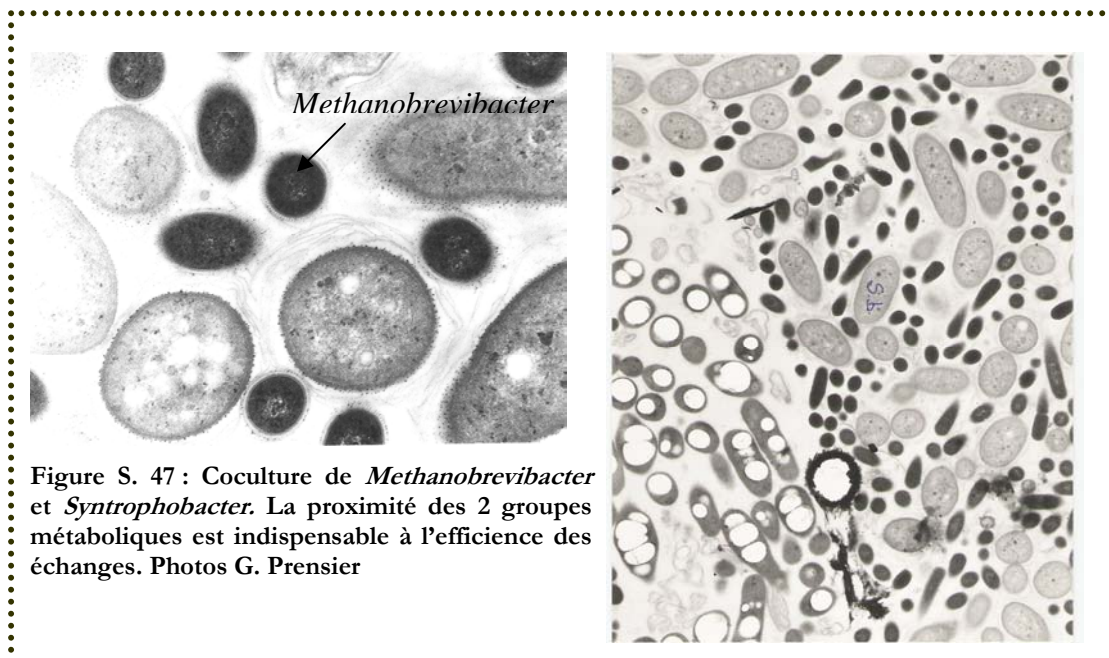


Figure S. 46 : Exemple d'écosystèmes hébergeant un méthanogénèse active et de facteurs pouvant conditionner son efficacité.



Cette position implique l'établissement d'interactions syntrophiques (Figure S. 47), notamment *via* un transfert interspécifique d'hydrogène (Wolin et Miller 1982). Ainsi depuis la découverte de l'organisme syntrophe S de la coculture de *Metanobacillus omelianski* (Bryant *et al.* 1967), 11 genres de bactéries syntrophes ont été décrites comme partenaires des méthanogènes pour l'oxydation des alcools (*Pelobacter*), des acides gras (*Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophospora*, *Smithella*, *Thermosyntropha*, *Clostridium*, et *Eubacterium*), de l'acide benzoïque (*Syntrophus*), du fructose (*Syntrophococcus*) ou du glycolate (*Syntrophobotulus*).

La distribution des méthanogènes est d'autre part sous la dépendance de différents inhibiteurs métaboliques. Ainsi, les méthanogènes sont particulièrement sensibles à de faibles pressions partielles en O₂ (<10ppm), pouvant entraîner une dissociation irréversible du complexe enzymatique de la F420-hydrogénase (Schönheit *et al.* 1981, Garcia *et al.* 2000). Les accepteurs terminaux d'électrons, comme les nitrates ou les sulfates, peuvent inhiber la méthanogénèse en canalisant le flux d'électrons vers des processus thermodynamiquement plus efficaces, comme la dénitrification et la sulfato-réduction (Ward et Winfrey 1985a et b, Raskin *et al.* 1996). Dans les environnements aquatiques (lacustres ou marins), si l'acétate apparaît être un des principaux précurseur de la méthanogénèse (Cappenberg 1974, Cappenberg et Prins 1974, Abram et Nedwell 1978), l'H₂ constitue un facteur limitant (Oremland et Taylor 1978). Dans ces environnements, la méthanogénèse H₂-dépendante résulterait d'un transfert interspécifique d'H₂ à l'intérieur de flocs ou de consortia microbiens (Conrad *et al.* 1985).

III- PROCESSUS METABOLIQUES ANAEROBIES RECEMMENT MIS EN EVIDENCE : OAM, ANAMMOX, OXYDATION ANAEROBIE DU FER FERREUX.

Un certain nombre de paradigmes, notamment celui de l'exclusion mutuelle des BSR et des méthanogènes, sont longtemps restés classiques en écologie microbienne (Smith 1993, Widdel 1988). Il était en effet admis, que les avantages cinétiques et thermodynamiques des BSR pour l'acquisition des substrats classiques (Ward *et al.* 1985a; Raskin *et al.* 1996), conduisaient à l'exclusion des méthanogènes dans les environnements naturels riches en sulfates (milieux sédimentaires marins). Par opposition, dans les environnements pauvres en sulfates, les méthanogènes domineraient l'acquisition de l'acétate et de l'hydrogène. Les relations entre ces deux types trophiques apparaissent cependant plus complexes que celles initialement envisagées. Dans de nombreux habitats naturels une occurrence simultanée des BSR et des méthanogènes est observée. Si l'utilisation de substrats non compétitifs par les méthanogènes (méthylamines, méthanol) (Widdel et Bak 1992) ou d'accepteurs d'électrons alternatifs par les BSR (comme le Fe (III), Lovley 2003) peuvent expliquer cette coexistence, de récentes études d'écosystèmes

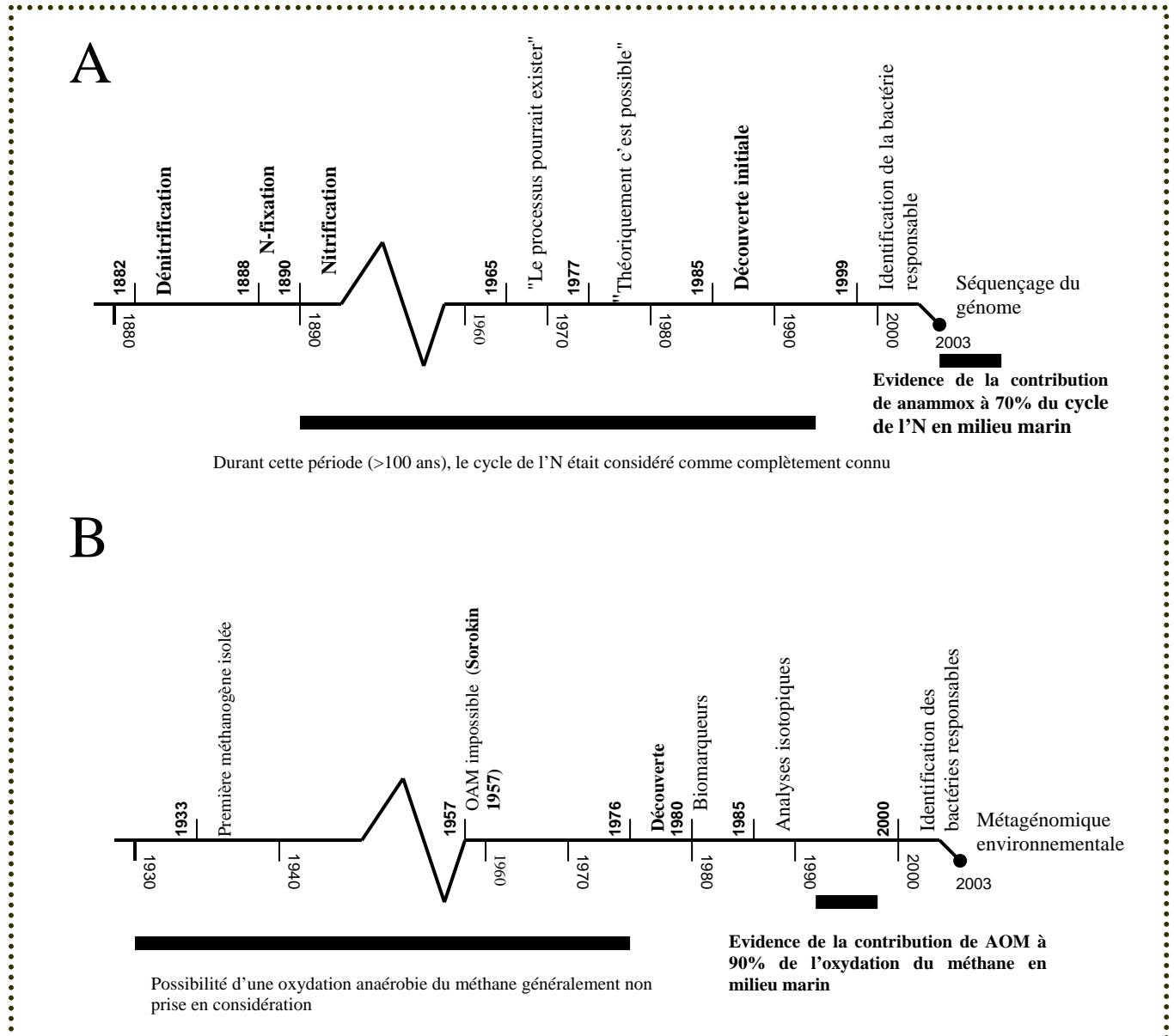


Figure S. 48: Découvertes successives sur les processus d'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) et du méthane (OAM).

sédimentaires marins ont révélé que ces deux groupes métaboliques réservent de nombreuses autres surprises. Il apparaît en effet que les interactions entre ces deux communautés hydrogénotrophes dépassent le simple cadre de la compétition. La mise en évidence du processus de réoxydation anaérobie du méthane (**Boetius et al. 2000**) a bouleversé la vision des microbiologistes et des écologistes microbiens sur ces communautés. Ce processus implique d'une part l'existence d'une relation syntrophique entre des *Archaea* méthanogènes et des bactéries sulfato-réductrices, et d'autre part, que le CH₄, considéré comme inerte en conditions anaérobies, puisse être à la base d'une chaîne trophique anaérobie.

III.A. Oxydation anaérobie du méthane et de l'ammonium

III.A.1. Historique (Figure S. 48)

D'un point de vue biochimique, le méthane et l'ammonium sont deux composés difficiles à activer. En conditions aérobies, leur activation est catalysée par des mono oxygénases présentant des radicaux à hauts potentiels énergétiques, inaccessibles pour la vie en anaérobiose. Cette caractéristique biochimique couplée à l'incapacité de détecter *in vitro* des organismes capables de croissance anaérobie sur ces composés (**Richards 1965, Sorokin 1957**), ont conduit au postulat que le méthane et l'ammonium étaient inertes en conditions anoxiques.

Dans les années 1970, plusieurs études indépendantes ont révélé que les concentrations en méthane diminuaient depuis les sédiments vers la colonne d'eau des océans. Ces observations couplées à la mise en évidence d'une diminution des concentrations en sulfates depuis la colonne d'eau vers les sédiments, ont suggéré que les ions sulfates pourraient être les accepteurs finaux d'électrons dans un processus conduisant à l'oxydation anaérobie du méthane (OAM). Des études *in vitro* ont également suggéré que le processus OAM pourrait se réaliser *via* un consortium d'*Archaea* méthanogènes et de bactéries sulfato-réductrices (**Zehnder et Brock 1979**). La confirmation expérimentale de cette hypothèse n'a été cependant que très récemment obtenue par la détection *in situ* de biomarqueurs lipidiques spécifiques d'*Archaea* et de BSR appauvris en ¹³C, par des constructions de banques de clones, par l'utilisation de sondes en hybridation *in situ* (**Boetius et al. 2000**), ainsi que par l'établissement du lien entre les signatures isotopiques et l'identité phylogénétique des microorganismes impliqués (**Orphan et al. 2003**).

Le postulat d'une oxydation de l'ammonium en conditions anoxiques émane de calculs basés sur le rapport de Redfield dans les écosystèmes marins (**Richards 1965**) et sur des considérations thermodynamiques théoriques (**Broda 1977**).

Ce processus, dénommé anammox a été démontré à partir des années 1980 (Mulder *et al.* 1995, Van de Graaf *et al.* 1996). Bien que le microorganisme impliqué n'ait pu être isolé en culture pure, la bactérie responsable a été physiquement purifiée par des centrifugations en gradient de densité (Strous *et al.* 1999, 2002). Ces expérimentations ont permis l'identification des cellules impliquées, l'étude détaillée de leur physiologie (Strous *et al.* 1998, 1999), l'identification et l'étude structurale des lipides anammox (Schouten *et al.* 2003), la purification d'enzymes clés (Schalk *et al.* 2000) et le séquençage complet du génome de *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* (en cours d'assemblage et d'annotation).

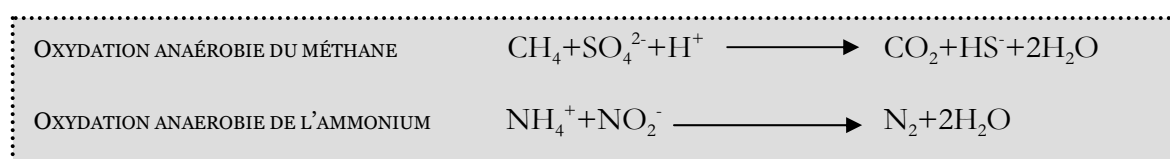


Figure S. 49: Processus cataboliques d'oxydation anaérobie du méthane et de l'ammonium.

Les processus Anammox et OAM ont été mis en évidence dans de nombreux écosystèmes marins [colonne d'eau de la Mer Noire (Kuypers *et al.* 2003, Michaelis *et al.* 2002), Golfe de Dulce (Costa Rica, Dalsgaard et Thamdrup 2003)]. Le processus OAM a été suggéré dans certains écosystèmes lacustres pour des températures comprises entre 4°C et 30°C (Zehnder et Brock 1979, Lehours *et al.* 2004, Schouten *et al.* 2003), et Anammox, quant à lui, a récemment été mis en évidence dans des sédiments lacustres (Trimmer *et al.* 2003). Si l'importance globale de ces processus dans les écosystèmes marins a clairement été mise en évidence, leur signification écologique dans les zones anaérobies d'écosystèmes aquatiques continentaux reste largement inexplorée.

III.A.2. Diversité des microorganismes impliqués

Cette section sera essentiellement consacrée à la diversité phylogénétique des microorganismes impliqués dans ces deux processus. Une publication de synthèse (Strous et Jetten 2004) relate des connaissances actuelles sur la physiologie, la biochimie et la structure cellulaire des bactéries impliquées dans le processus anammox, la physiologie des bactéries OAM restant peu connue car aucune souche (ou consortium) n'est actuellement disponible en culture.

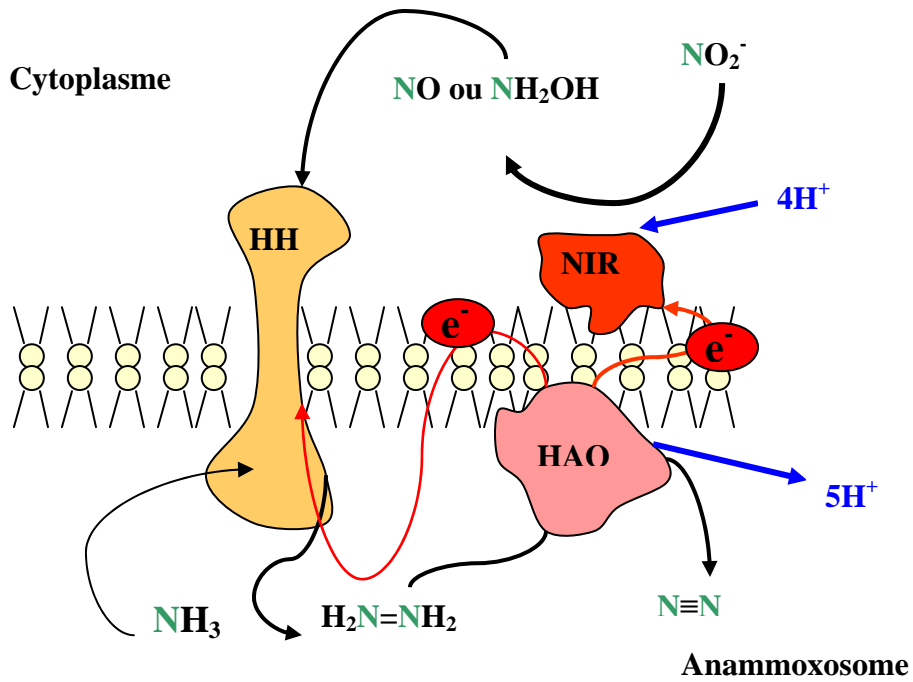


Figure S. 50 : Voie biochimique possible pour le processus anammox conduisant à la production de $^{29}\text{N}_2$ à partir d'un substrat (ammonium ou nitrite ^{15}N -marqués). Dans ce modèle, la force proton-motrice est générée par la membrane de l'anammoxosome via la séparation des charges.

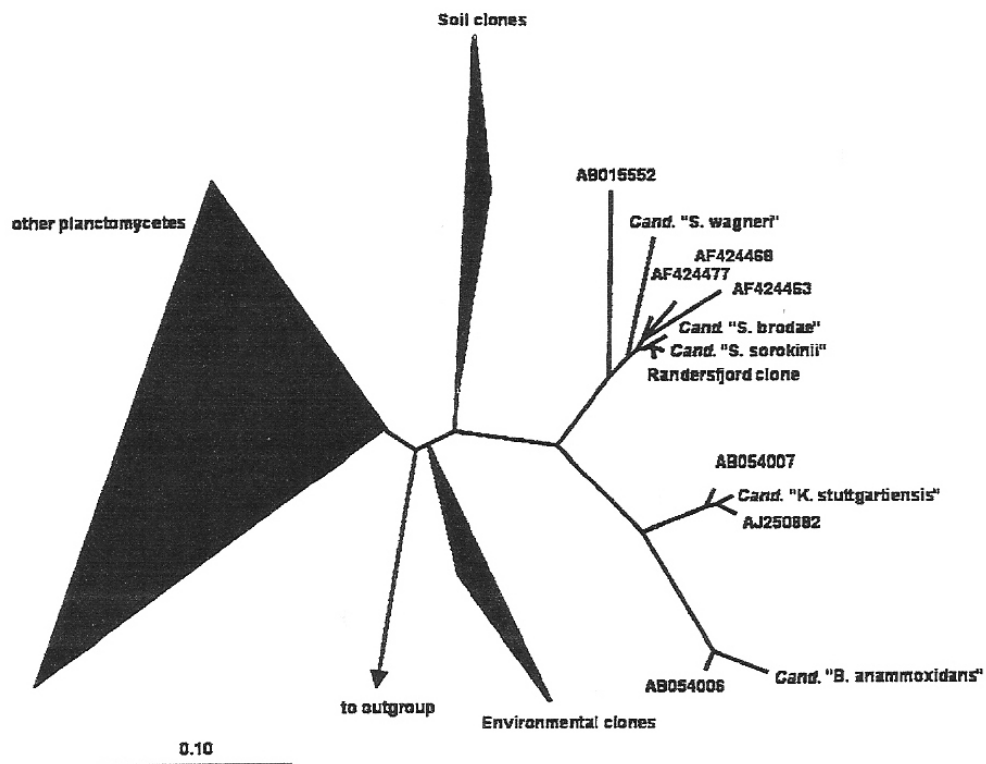


Figure S. 51: Positionnement phylogénétique des *Planctomycetes* impliquées dans le processus anammox. D'après Strous et Jetten 2004.

■ **LES BACTERIES ANAMMOX** appartiennent à trois genres "*Candidatus Brocadia*" (Strous *et al.* 1999), "*Candidatus Kuenenia*" (Egli *et al.* 2001, Fujii *et al.* 2002, Schmid *et al.* 2003), "*Candidatus Scalindua*" (Kuypers *et al.* 2003, Strous *et al.* 1999) constituant un groupe monophylétique affilié aux *Planctomycetales* (Figure S.51). Les distances phylogénétiques entre les différentes espèces sont néanmoins importantes. Ainsi, les espèces des genres "*Candidatus Scalindua*" et "*Candidatus Brocadia*" présentent seulement 85% d'identité de séquences ARNr16S et pourraient être la conséquence d'une évolution rapide et d'une origine évolutive précoce du phylum des *Planctomycetales* (Strous et Jetten 2004). Les différentes espèces exhibent un métabolisme identique et présentent une ultrastructure similaire, caractérisée par la présence d'un anammoxosome (Figure S. 50). La voie de fixation du CO₂ via l'oxydation anaérobie de l'ammonium, est encore inconnue mais conduit à un fractionnement du carbone ($\delta^{13}\text{C}$ -24 à -50‰ par rapport au bicarbonate). La voie des pentoses phosphates ou de réduction de l'acétyl-CoA apparaissent néanmoins les plus probables (Schmid *et al.* 2003) et l'oxydation des nitrites en nitrates fournirait les électrons nécessaires à la fixation du CO₂ (Van de Graaf *et al.* 1997a et b).

■ **CONSORTIA OAM** : Les *Archaea* impliquées dans le processus OAM sont positionnées au sein de deux groupes paraphylétiques de bactéries méthanogènes (Figure S. 52, S. 53a). Le groupe ANME-2 est affilié aux méthanogènes acétoclastiques *Methanosarcina*, et le groupe ANME-1 se positionne entre les méthanogènes acétoclastes et non acétoclastes. Sur la base de leurs séquences ADNr16S, ces deux groupes présentent approximativement 81% d'identité (Hallam *et al.* 2003, Orphan *et al.* 2002), indiquant que les *Archaea* méthanogènes réalisant OAM pourraient présenter différents phénotypes et que la capacité d'inverser la méthanogénèse a pu évoluer à partir de la méthanogénèse (ou inversement !), (Strous et Jetten 2004). L'identification d'*Archaea* méthanogènes opérant en inverse et de bactéries sulfato-réductrices comme les acteurs de ce processus, suggère que les voies métaboliques connues de la sulfato-réduction et de la méthanogénèse sont impliquées. Les premières études de génomique environnementale (Hallam *et al.* 2003) confirment cette hypothèse, ainsi la Méthyl coenzyme M réductase qui catalyse l'étape terminale de la méthanogénèse est probablement impliquée dans la première étape de OAM. Ces observations suggèrent que les voies métaboliques de OAM peuvent être partiellement les mêmes que celles de la méthanogénèse, à l'exception de l'étape d'activation du méthane (Strous et Jetten 2004).

Les sulfato-réductrices syntrophes des *Archaea* ANME1 et ANME2 sont majoritairement affiliées à la sub-division *delta-Proteobacteria* (Figure S.53b) et plus particulièrement à l'ordre des *Desulfosarcinales* (Orphan *et al.* 2001b). Les gènes codant pour la sulfite-réductase des populations

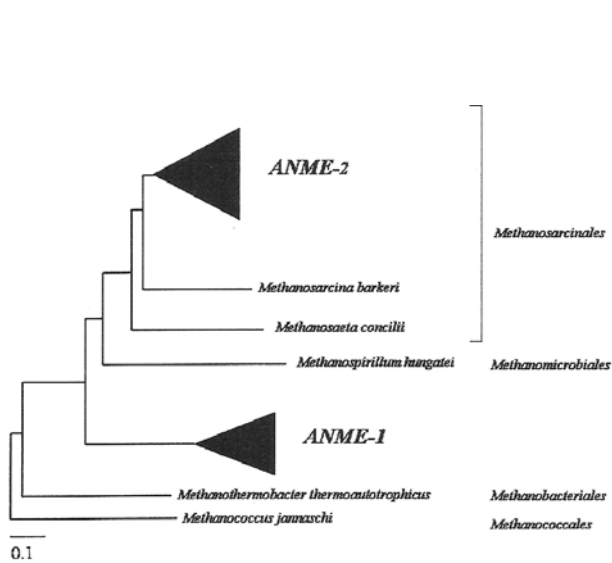


Figure S. 52 : Phylogénie des *Archaea* impliquées dar OAM, d'après Strous et Jetten 2004

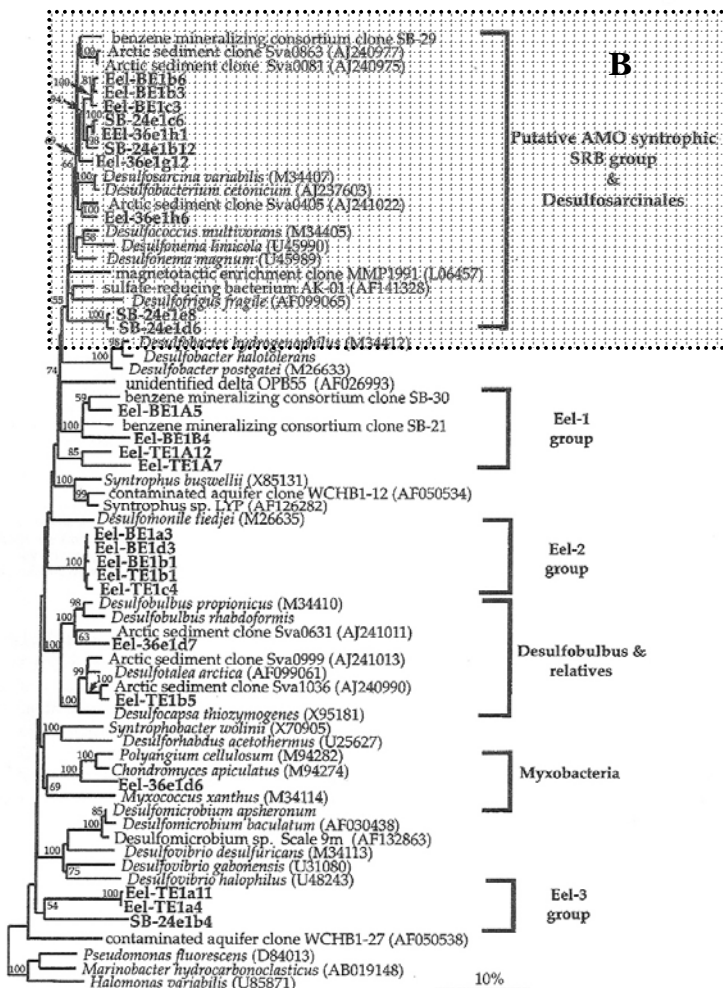


Figure S. 53 : (A) Arbre phylogénétique illustrant les relations entre les séquences environnementales de clones ARNr16S d'*Archaea* issus du bassin Santa Barbara et du bassin de l'Eel river, d'après Orphan *et al.* 2001b. (B) Arbre phylogénétique illustrant les relations entre les clones ARNr16S de *δ-Proteobacteria* du Bassin Santa Barbara et Eel River. D'après Orphan *et al.* 2001b.

de BSR présentes au niveau de la transition sulfate-méthane forment un groupe séparé des gènes des BSR cultivées (Thomsen *et al.* 2001). Ces observations couplées aux séquences ARNr16S suggèrent que si les voies métaboliques peuvent être identiques, la sulfato-réduction dans le processus OAM pourrait être réalisée par des bactéries spécialisées (Strous et Jetten 2004).

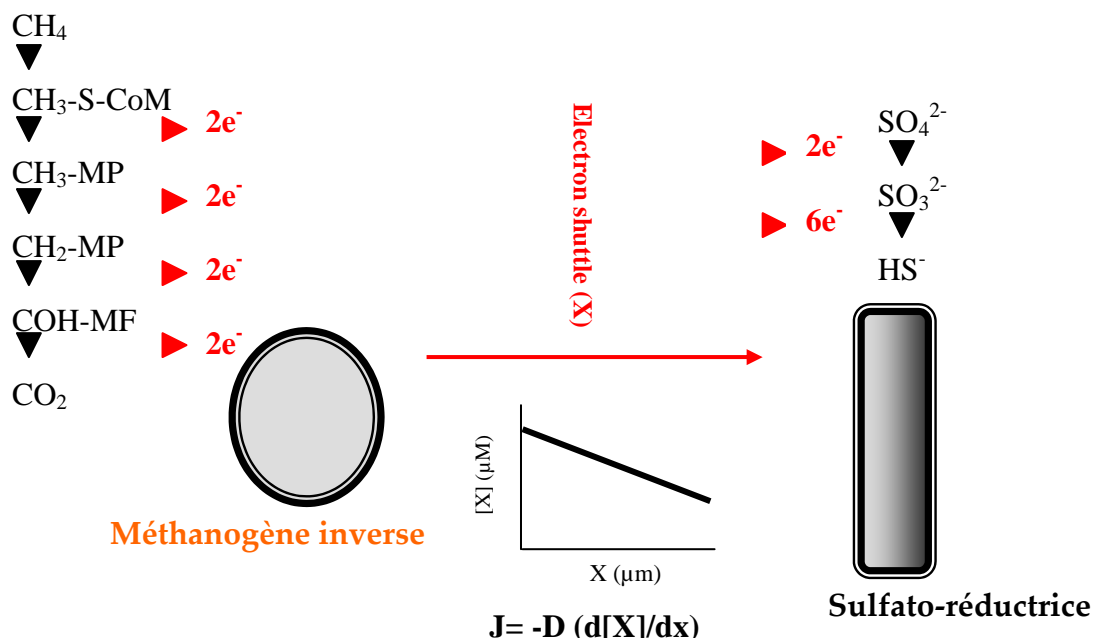


Figure S. 54: Voie biochimique possible pour le processus d'oxydation anaérobie du méthane. La méthanogène opérant en inverse cède les électrons à l'accepteur intermédiaire d'électrons, qui est utilisé par la BSR. La première loi de diffusion de Fick postule qu'un gradient de concentration de l'accepteur intermédiaire d'électrons peut exister entre les deux organismes partenaires. Ce gradient limite l'efficacité thermodynamique et cinétique du processus global. CoM : coenzyme M, MP : méthanoptérine, MF : méthanofurane.

Une question clé dans le processus OAM est l'identification du composé échangé entre les *Archaea* et les BSR ("navette électronique", Figure S. 54). Le formate (Sørensen *et al.* 2001) et l'acétate (Valentine 2002) sont des métabolites candidats potentiels. L'implication de différents accepteurs intermédiaires d'électrons pourrait expliquer la différenciation des niches écologiques des *Archaea* impliquées dans OAM (ANME-1, ANME-2, Strous et Jetten 2004). Orphan *et al.* (2003) ont, quant à eux, mis en évidence que les lipides des *Archaea* OAM sont plus appauvris en ^{13}C que ceux des BSR. Ces résultats indiqueraient que les BSR utilisent le CO_2 comme source de carbone et non un accepteur d'électrons organique intermédiaire dérivant du méthane appauvri. Les recherches sur le processus OAM s'orientent vers des essais d'activités *in vitro* via des enrichissements en bioréacteurs (Nauhaus *et al.* 2002) et le premier enrichissement partiel OAM a été obtenu (Girguis *et al.* 2003). Cependant, si l'ensemble des études s'oriente actuellement sur un consortium syntrophique impliquant une *Archaea* méthanogène et une bactérie sulfato-

réductrice, il ne peut être exclu qu'un microorganisme méthanotrophe (ex : une bactérie sulfato-réductrice) soit capable de réaliser seul ce processus oxydatif (**Strous et Jetten 2004**).

III.A.3. Conclusions

La biodiversité des organismes OAM et anammox s'étendra certainement avec l'étude de nouveaux habitats et il sera intéressant de voir si cette diversité contribuera à une extension des groupes connus ou si de nouveaux groupes de bactéries OAM et anammox pourront être révélés. Il apparaît désormais que ces deux processus sont quantitativement importants dans le cycle global des éléments (75% de l'oxydation du méthane dans les écosystème sédimentaires marins et 30 à 50% de l'oxydation de l'ammonium), bien qu'ils soient restés longtemps insoupçonnés et que les premières évidences aient soulevé un fort scepticisme de la communauté scientifique. Si le dogme de l'inertie du méthane et de l'ammonium en conditions anoxiques a pu être franchi, cette histoire permettra peut être de désacraliser d'autres paradigmes, et stimulera peut être des recherches sur des voies métaboliques impliquant des composés "atypiques", permettant la mise en évidence de nouvelles voies métaboliques microbiennes. Des possibilités prometteuses s'orientent vers le couplage de OAM avec les nitrates et ou le Fer (III), ou encore de anammox avec le Fer (III) ou le Mn (IV) (**Strous et Jetten 2004**).

III.B. Oxydation anaérobie du fer ferreux (FeII).

III.B.1. Oxydation anaérobie du Fe(II) par les bactéries phototrophes.

L'oxydation biologique anaérobie du Fe(II) initialement mise en évidence chez des bactéries phototrophes anoxygéniques (**Widdel *et al.* 1993**), a révélé que le fer ferreux pouvait être réoxydé dans les écosystèmes anoxiques. Ces bactéries phototrophes ferro-oxydantes ont été isolées de sédiments marins et lacustres, et sont phylogénétiquement associées à différents genres de bactéries phototrophes pourpres ou vertes (**Ehrenreich et Widdel 1994, Heiseing et Schink 1998, Heiseing *et al.* 1999, Straub *et al.* 1999**). Le potentiel redox du couple FeIII/FeII dans les environnements bicarbonatés est d'environ +100mV à pH7, celui du photosystème des bactéries vertes et pourpres est de +300mV à +450mV (**Widdel *et al.* 1993, Clayton et Sistrom 1978**), rendant thermodynamiquement possible l'oxydation du Fe (II) par ces bactéries.

III.B.2. Oxydation anaérobie du Fe (II) par les bactéries dénitrifiantes.

L'oxydation anaérobie du Fe (II) peut également se réaliser à l'obscurité, *via* les nitrates comme accepteurs finaux d'électrons (**Straub et Buchholz-Cleven 1998, Benz *et al.* 1998**). A pH7, tous

les couples redox des formes successives apparaissant dans la dénitrification présentent des valeurs plus positives (valeurs de E'_0 : $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$: +430mV, NO_2^-/NO : +350mV, $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$: +1180mV, $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$: +1350mV, **Straub et al. 2001 d'après Thauer et al. 1977**) que celle du couple $\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)}$ et constitue donc des accepteurs d'électrons favorables pour l'oxydation du fer. La ferrihydrite[§] issu de cette réoxydation anaérobie constitue un excellent accepteur d'électrons pour la réduction dissimilatrice du Fe(III) (**Straub et al. 1998**). L'oxydation anaérobie du Fe(II) *via* la réduction des nitrates ne restreint pas ce processus aux zones photiques et ce dernier est probablement plus important à l'échelle globale que l'oxydation anaérobie du Fe(II) par les bactéries phototrophes (**Straub et al. 2001**). Il pourrait ainsi significativement contribuer aux flux d'électrons dans les environnements anoxiques et à l'importance écologique des bactéries ferro-réductrices.

IV- AUTRES POTENTIALITES METABOLIQUES DES BACTERIES ANAEROBIES : UTILISATION ET DEGRADATION DE COMPOSES AROMATIQUES.

Environ 25 % de la biomasse terrestre est composée de molécules, d'origines naturelles (lignine) ou anthropiques (composés xénobiotiques), comprenant un noyau benzénique comme principal composant structural (**Gibson et Harwood 2002**). Le recyclage de nouvelles structures moléculaires, résultantes des activités humaines, pose des défis majeurs aux communautés microbiennes et il apparaît que la plupart de ces composés trouvent leurs voies de dégradation dans les sédiments anaérobies (**Gibson et Harwood 2002**). Notre connaissance des processus de biodégradation des composés aromatiques dans les environnements anoxiques s'est considérablement accrue durant la dernière décennie, résultant notamment de l'isolement de souches microbiennes capables de dégrader des composés aromatiques. Ces isolats ont permis des analyses physiologiques, biochimiques et de génétique moléculaire détaillées. Plusieurs facteurs ont facilité ces isollements, notamment la mise en évidence qu'une plus large gamme d'accepteurs terminaux d'électrons qu'initialement envisagée pouvait être utilisée dans les processus de respiration anaérobie. Si l'utilisation des nitrates, et des sulfates était connue depuis longtemps, l'importance écologique de la réduction dissimilatrice du Fe(III) et de la respiration chlorate n'a été que récemment révélée. De nombreuses publications sont parues sur les différents aspects, notamment biochimiques, de l'utilisation des composés aromatiques dans les métabolismes microbiens anaérobies (**Harwood et al. 1999, Heider et Fuchs 1997, 1999, Lovley 1997b, 2000, Schink et al. 2000, Widdel et Rabus 2001**), et dans cette section ne sera abordée que l'utilisation

[§] Ferrihydrite : $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: composés présentant une oxydation complète du fer, mal cristallisé, sa structure se caractérise par la présence de nombreuses lacunes de fer. Présente une ressemblance avec l'hématite.

des composés aromatiques monocycliques comme accepteurs finaux ou intermédiaires ("navettes") d'électrons et comme sources de carbone et/ou d'énergie.

IV.A. Composés aromatiques comme accepteurs terminaux ou intermédiaires d'électrons.

L'utilisation de composés aromatiques substitués comme accepteurs finaux d'électrons par certains microorganismes anaérobies, conduit à des modifications des substituants (Figure S. 55) sans perturbation du noyau benzénique. Certains composés aromatiques, comme les quinones extracellulaires, peuvent également servir d'accepteurs d'électrons intermédiaires ("navettes") et être impliqués dans le transfert d'électrons depuis la chaîne respiratoire d'un organisme jusqu'à un accepteur d'électrons insoluble ou à un autre microorganisme (Lovley *et al.* 1999). L'implication des quinones comme accepteurs intermédiaires d'électrons a été abordé précédemment (exemple du rôle des substances humiques dans la réduction dissimilatrice du Fe (III)), et ne sera abordé dans ce paragraphe que le processus de déhalogénéation réductive.

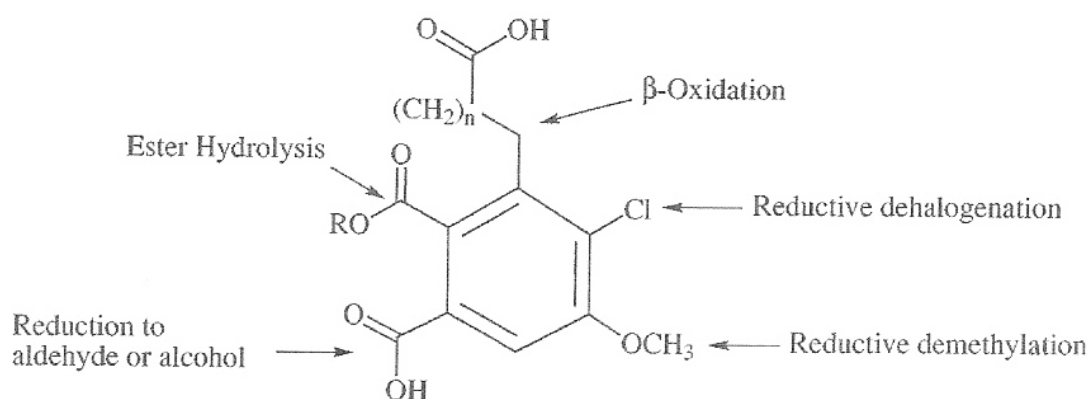


Figure S. 55 : Principales attaques des substituants de noyaux aromatiques catalysées par des microorganismes. (D'après Gibson et Harwood 2002).

La contamination chronique par des composés halogénés issus des activités industrielles a conduit à des études intensives sur leur dégradation dans les environnements anoxiques. Ces dernières ont révélé que les déhalogénations réductives de composés aromatiques et aliphatiques se réalisaient rapidement dans les sédiments anaérobies (Wiegel et Wu 2000), et de nombreuses bactéries anaérobies strictes ou facultatives catalysant ces réactions ont été isolées en culture (Holliger *et al.* 1999). Les potentialités cataboliques de ces bactéries sont néanmoins plus performantes avec d'autres accepteurs d'électrons comme les nitrates ou les sulfates. Cependant, l'utilisation des composés halogénés est favorisée par la présence de composés carbonés faiblement réduits, comme l'acétate ou le lactate, mais également par la faible disponibilité des autres accepteurs d'électrons (Gibson et Harwood 2002). Par exemple, *Desulfitobacterium frappieri* réalise une

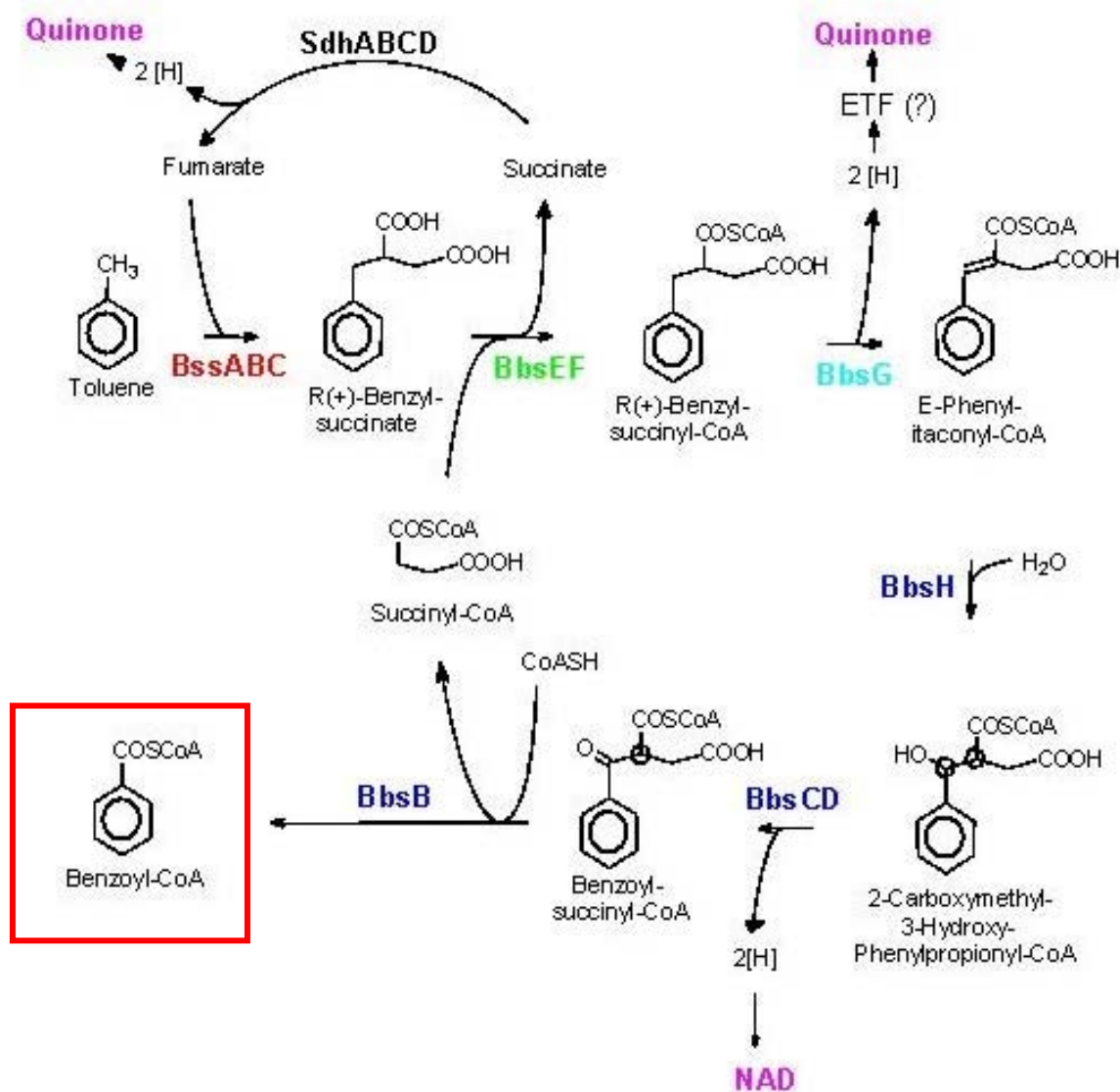


Figure S. 56 : Métabolisme anaérobie du toluène.

(<http://www.biologie.unifreiburg.de/data/bio2/fuchs/ForschungJohannHeider.htm>)

respiration chlorate sur une large gamme de chlorobenzoates aromatiques ou de phénols, mais est également capable d'utiliser des accepteurs d'électrons comme les sulfites, les thiosulfates ou les nitrates lorsque la source de carbone est le pyruvate (**Bouchard *et al.* 1996**).

IV.B. Utilisation des Composés aromatiques comme sources d'énergie ou de carbone (Annexe 1).

Les microorganismes capables d'utiliser les composés aromatiques comme sources de carbone ou d'énergie, en conditions anaérobies, sont largement distribués au sein du domaine des *Eubacteria*, cependant jusqu'à très récemment aucune *Archaea* présentant cette capacité n'avait été décrite. En **2001** le groupe de **Derek Lovley** a mis en évidence l'oxydation par *Ferroglobus placidus*, *Archaea* hyper thermophile anaérobie stricte, de composés aromatiques couplée à la réduction du Fe(III). La minéralisation complète des molécules aromatiques en conditions anoxiques apparaît être un trait phénotypique spécifique des procaryotes (**Harwood et Gibson 1997**), bien que certains champignons puissent réaliser des attaques superficielles mais déstructurantes sur ces molécules complexes. Comme pour les composés halogénés, la toxicité potentielle et la large distribution des composés hydrocarbonés aromatiques a conduit à une multiplication des études sur leurs dégradations. La stratégie utilisée par les bactéries anaérobies, de différents types physiologiques, pour la dégradation de composés mono aromatique (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène, **Heider *et al.* 1999**) implique une attaque initiale consistant à les convertir en benzoyl-CoA ([Figure S. 56](#)). Dans les environnements naturels contaminés (sols, aquifères...), la dégradation du benzène est couplée à la réduction du Fe (III), des nitrates ou des sulfates (**Anderson et Lovley 2000, Heider *et al.* 1999**). **Coates *et al.* (2001)** ont notamment mis en évidence la capacité de deux souches de *Dechloromonas* à croître sur le benzène comme seule source de carbone lorsque les nitrates étaient ajoutés comme accepteur final d'électrons.

IV.C. Remarques

Les potentialités de dégradation anaérobie de composés aromatiques (incluant des xénobiotiques) par les microorganismes est désormais mieux connue, et l'isolement en culture pure de microbes métaboliquement divers catalysant ces dégradations a pu servir de base à l'étude des voies enzymatiques impliquées dans ces dégradations. Comprendre comment l'acquisition et l'utilisation des voies de dégradation des composés aromatiques contribuent au succès de l'organisme dans l'environnement biologique et physique dans lequel il vit est un défi intéressant (**Gibson et Harwood 2002**). En effet, à l'exception de certaines halo-rés respirations, les composés aromatiques sont les substrats énergétiquement les moins favorables pour les anaérobies et les enzymes de dégradation ne sont inductibles que dans des conditions appropriées. L'accès aux

génomés complets de ces microorganismes, permettra d'apprécier l'expression différentielle des enzymes impliquées (*via* des puces métaboliques) en réponse aux modifications environnementales. Ces développements techniques pourront avoir une influence majeure sur notre compréhension de la dégradation des composés aromatiques en anaérobie, ainsi que sur notre capacité à utiliser ces processus naturels à des fins bénéfiques pour l'homme.

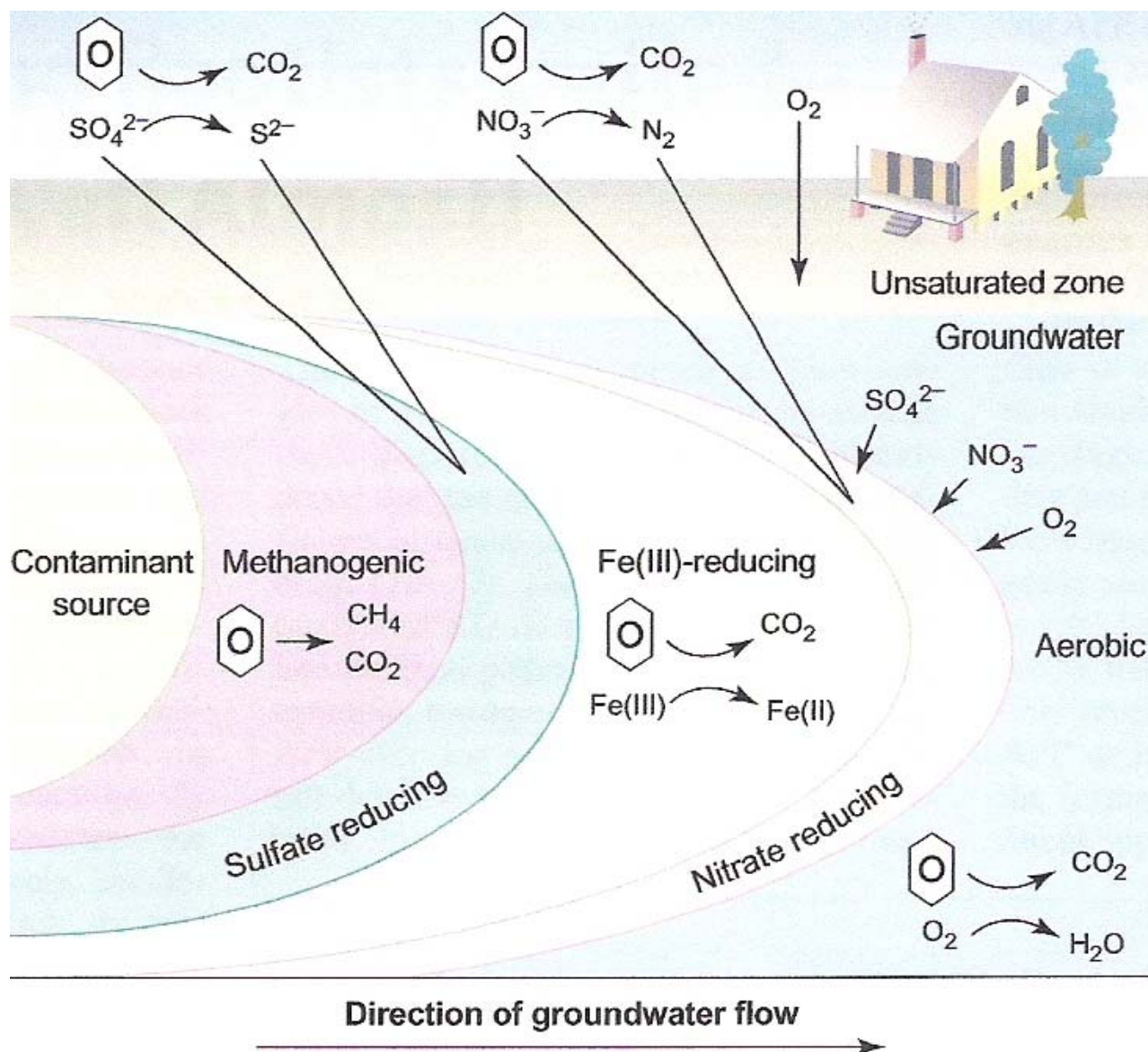


Figure S. 57: Processus microbiens dans un aquifère contaminé par des hydrocarbures (pétrole). L'oxygène inhibe l'activité des anaérobies mais n'est disponible que dans une mince frange de la zone contaminée. En conditions anoxiques, les anaérobies utilisent des accepteurs d'électrons comme les nitrates, le Fe(III), ou les sulfates pour oxyder le benzène ou d'autres contaminants. Lorsque ces accepteurs d'électrons sont épuisés, le processus de méthanogénèse intervient permettant de convertir la MO en méthane et CO_2 . La production de méthane est ainsi localisée à proximité de la source de contamination. D'après Lovley 2001.

IV.D. "Anaerobe to the rescue"

De nombreux environnements contaminés, typiquement les eaux souterraines, présentent de faibles concentrations en oxygène. Ainsi, le plus ancien processus de l'histoire du vivant-le métabolisme microbien sans O_2 -est montré comme une force potentielle pour résoudre des problèmes très modernes. Le titre de ce paragraphe, emprunté à **D. Lovley (2001)**, résume, d'une certaine façon, les attentes et les espoirs que les scientifiques placent dans les capacités bioremédiatives des microorganismes anaérobies. Jusqu'à très récemment, l'application pratique des méthodes de bioremédiation *in situ* étaient focalisées sur les microorganismes aérobies (**Alexander 1999**), ces derniers en présence d'oxygène peuvent en effet oxyder les contaminants organiques en CO_2 . Cependant, les limites inhérentes de cette approche résultent essentiellement de l'appauvrissement en O_2 dans les environnements contaminés (écosystèmes souterrains ou consommation progressive de l' O_2 par les microorganismes aérobies jusqu'à épuisement). En conséquence, l'attention sur le rôle potentiel des bactéries anaérobies dans les processus de bioremédiation s'est accrue ces dernières années. Ces microorganismes, comme souligné dans les sections précédentes, sont en effet capables d'oxyder des composés organiques en CO_2 *via* l'utilisation d'accepteurs d'électrons comme le Fe (III), les nitrates, les sulfates... (**Figure S. 57**).

■ CONTAMINATION PAR LES SOLVANTS CHLORES : Un problème de bioremédiation particulier est posé dans les environnements contaminés par des solvants chlorés. Les microorganismes aérobies ne présentent pas les capacités cataboliques de dégradation des contaminants chlorés classiques comme le chloroéthène (PCE) ou le trichloroéthène (TCE) dans les conditions typiquement rencontrées dans les aquifères (**Lee et al. 1998**). Certaines espèces de bactéries anaérobies peuvent utiliser ces composés comme accepteurs finaux d'électrons (en éliminant le substituant Cl) (**Lee et al. 1998**).

■ CONTAMINATION PAR LES NITRATES : Le rôle des microorganismes anaérobies peut également s'avérer un atout majeur dans les problèmes de contamination par les nitrates résultant de l'utilisation intensive de fertilisants (bactéries dénitrifiantes)

■ CONTAMINATION PAR LES METAUX (EX : URANIUM, CHROME, COBALT, TECHNETIUM) ET LES METALLOÏDES (EX: SELENIUM, ARSENIC) : ces composés sont présents dans les environnements aérobies sous forme soluble et donc mobile. En conditions anoxiques, les microorganismes peuvent les réduire en forme insoluble (**Lloyd et Lovley 2001**). Ces éléments précipités sont donc "immobilisés", limitant ainsi leur distribution dans les aquifères et les eaux souterraines.



Figure S. 58 : Les communautés microbiennes présentent différentes réponses en regard des contaminations.

Ces stratégies de bioremédiation anaérobies *in situ* sont prometteuses mais une recherche substantielle doit être réalisée pour permettre leurs applications. Afin de caractériser les facteurs environnementaux conditionnant l'activité bioremédiatrice des microorganismes *in situ*, il est essentiel d'identifier les bactéries responsables (Figure S. 58). Les études conduites sur des aquifères contaminés ont révélé que les microorganismes impliqués dans les processus de dégradation des composés hydrocarbonés (**Rooney-Varga *et al.* 1999**), de déchloration réductives (**Fennell *et al.* 2001**) et de réduction des métaux (**Snoeyenbos-West *et al.* 2000**) étaient étroitement apparentés à ceux réalisant ces activités en culture pure. Le génome de ces isolats étant accessible, il pourra être possible de déterminer les gènes impliqués dans ces activités et ceux permettant à ces microorganismes de proliférer dans ces environnements.

Les informations biochimiques, génomiques, métaboliques couplées aux études géochimiques et hydrologiques permettront de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans l'activité bioremédiatrice *in situ* des anaérobies. Ceci permettra certainement d'évaluer le taux d'atténuation naturel des contaminants et de définir des stratégies rationnelles pour accélérer la dépollution d'environnements contaminés (**Lovley 2001**).

PRESENTATION DES SITES D'ETUDES

Le Lac Pavin et Le Lac d'Aydat



"Le lac Pink atteignait une profondeur de vingt mètres et son fond était recouvert de trois mètres de boue. [...] mais en raison même de cette profondeur, les eaux de surface ne se mêlaient pas aux eaux du fond. A partir de quinze mètres, celles-ci ne bougeaient plus, jamais remuées, jamais oxygénées, non plus que les vases qui renfermaient ses dix milles six cents ans d'histoire. Un lac d'apparence normale tout compte fait, mais recouvrant un second lac perpétuellement stagnant, sans air, mort, fossile de l'histoire. "

Fred Vargas, "Sous les vents de Neptune"

I^{ERE} PARTIE: LE LAC PAVIN

« Ce fut vraisemblablement, à l'origine un énorme trou plein d'eau, perdu dans la forêt celtique, à peine connu de quelques hardis chasseurs qui ne s'en approchaient sans doute qu'avec une crainte superstitieuse, car pour ces imaginations frustres il ne pouvait qu'être le séjour de génies sombres et malfaisants. »

(Le Lac Pavin, Guide du touriste et du naturaliste (A.Eusébio- Directeur de la station limnologique de Besse).

Même si ses dimensions modestes ne pouvaient donner la célébrité au Lac Pavin, sa forme, son site presque unique, son aspect sévère, les légendes farouches dont le parèrent, dès l'origine, l'imagination des hommes, lui ont conféré une primauté incontestée parmi les vingt autres lacs de la région des Monts Dore. Son nom même a contribué à son renom : Pavin, *Pavens* ("l'effrayant").

I. CONTEXTE GEOLOGIQUE

L'Auvergne et d'une façon générale l'ensemble du Massif Central Français ont été le siège d'importantes manifestations volcaniques et volcano-tectoniques au cours de l'ère quaternaire. Une de ces manifestations a abouti à l'édification de la chaîne des Puys.

I.A. La chaîne des Puys

La chaîne s'est édifiée sur le horst* cristallin du plateau des Dômes - vers 900 m d'altitude - séparé de la Limagne sédimentaire à l'Est (altitude moyenne 450 m), par une grande faille-limite. Elle est la dernière manifestation d'une longue histoire volcanique du Massif Central. Les périodes d'activité de la chaîne s'échelonnent entre 156000 et 7000 ans cal BP†, ce qui en fait l'ensemble volcanique le plus jeune de France métropolitaine. A la Chaîne des Puys au sens strict, comprenant les édifices situés entre le Puy de l'Enfer au sud et la zone de Beaunit au nord, sur une trentaine de kilomètres, et disposés sur un axe nord-sud, on doit rattacher les prolongements et satellites contemporains septentrionaux (Chalard, Gour de Tazenat...), occidentaux (vallée de la Sioule et retombée nord des Monts Dore), orientaux (région de Clermont) et les 4 volcans méridionaux (Pavin, Montchal, Montcineyre et Estivadoux) (Figure P. 1).

* Structure tectonique haute flanquée de chaque côté par des failles normales limitant des compartiments effondrés

† BP : Before Present

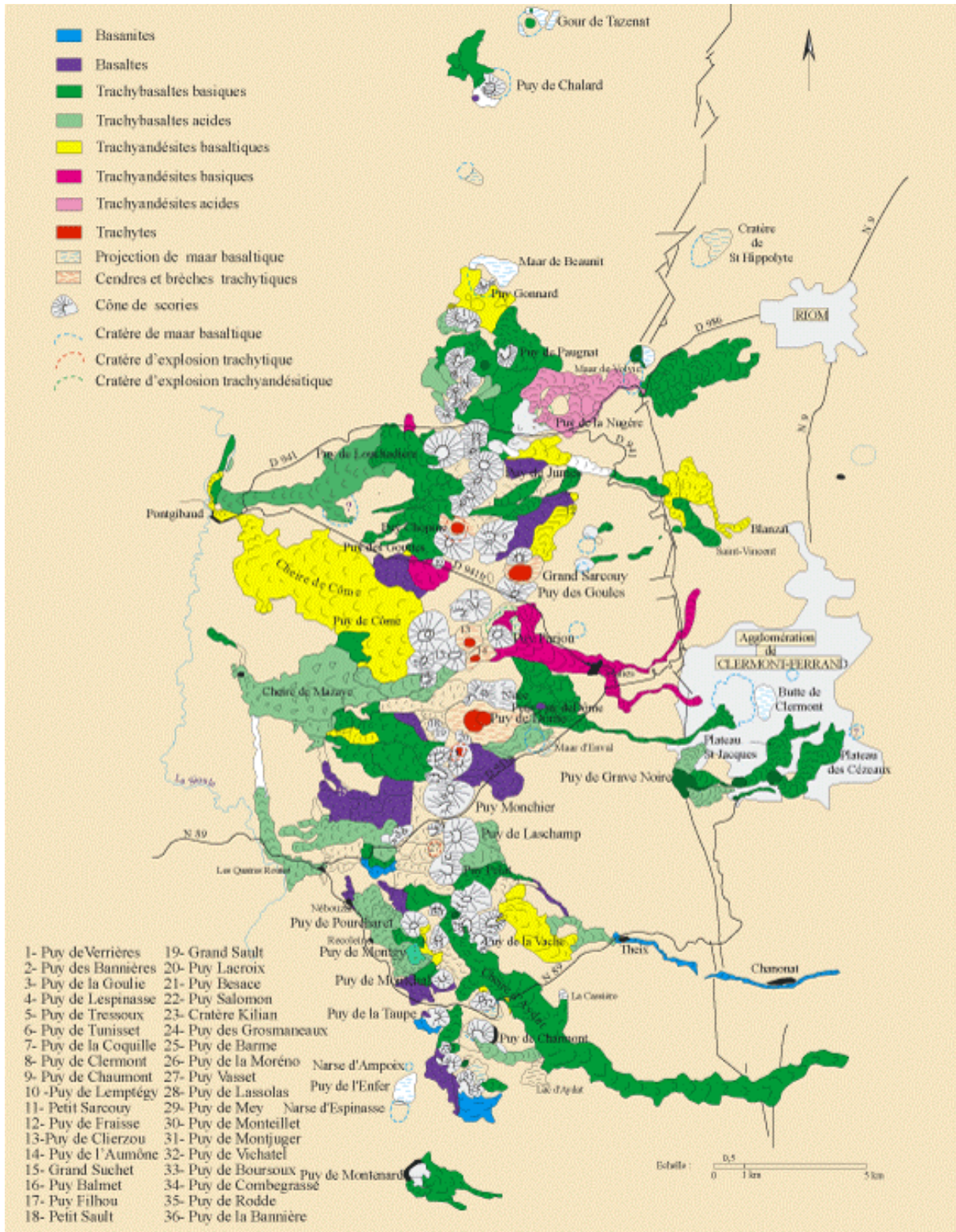


Figure P.1 : La chaîne des puys

Ceux-ci, vieux de 7000 ans seulement, reposent sur des laves plus anciennes à la jonction entre le Sancy et le Cézallier et sont donc les plus récents de la chaîne.

I.B. L'ensemble -Pavin-Montchal- les volcans les plus jeunes du Massif Central (Figure P.2)

L'ensemble Pavin-Montchal, constitué de 4 volcans, est situé au sud de la chaîne (annexe méridionale de la chaîne des Puys située à la limite Cézallier-Monts Dore). Le Lac Pavin, à une altitude de 1197m, est certainement la structure la plus impressionnante de cet ensemble volcanique. Il occupe une dépression circulaire découpée à l'emporte pièce dans des coulées et pyroclastites[‡] préexistantes. Il s'agit incontestablement, par la jeunesse de ses formes, la profondeur du lac, la présence de son anneau de brèche[§], d'un des plus beau maar du Massif Central.

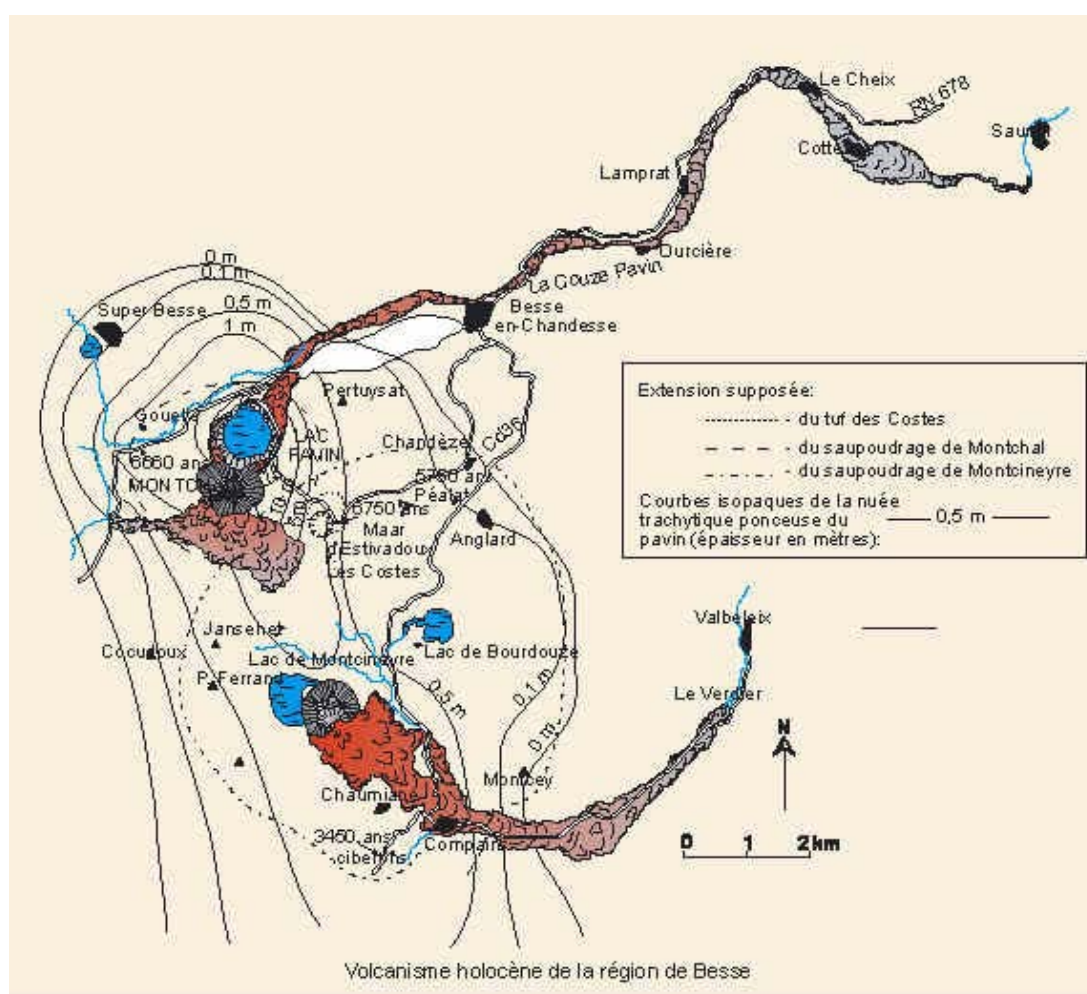


Figure P.2. L'ensemble Pavin-Montchal

[‡] Pyroclastites : roche formée par l'accumulation de débris volcaniques éjectés (projections).

[§] Brèche : terme très général désignant toutes les roches pyroclastiques comportant une certaine proportion d'éléments grossiers, mêlés à des éléments fins constituant le ciment (ou matrice).

La brèche qui saupoudre largement le plateau environnant (15 x 6 km) est constituée d'une matrice cendreuse et d'un mélange hétéroclite de blocs arrachés au substrat : granites et gneiss^{**}, trachyandésites^{††} montdoriens, vieux basaltes du Cézallier, basaltes récents du Montchal. La présence au sein de cette brèche de magma juvénile trachytique et de ponces de même nature ainsi que le recouvrement général de la brèche par ces produits témoigne d'une activité éruptive contemporaine de l'explosion phréatique. Le volume de l'éruption, consécutive à cette activité phréato-magmatique, est estimé à 75 millions de m³. Cette éruption est la dernière de la région. Elle a pu être datée par Carbone 14, grâce aux tourbières qui renferment les retombées aériennes issues de ces éruptions, à 7000 ans BP.

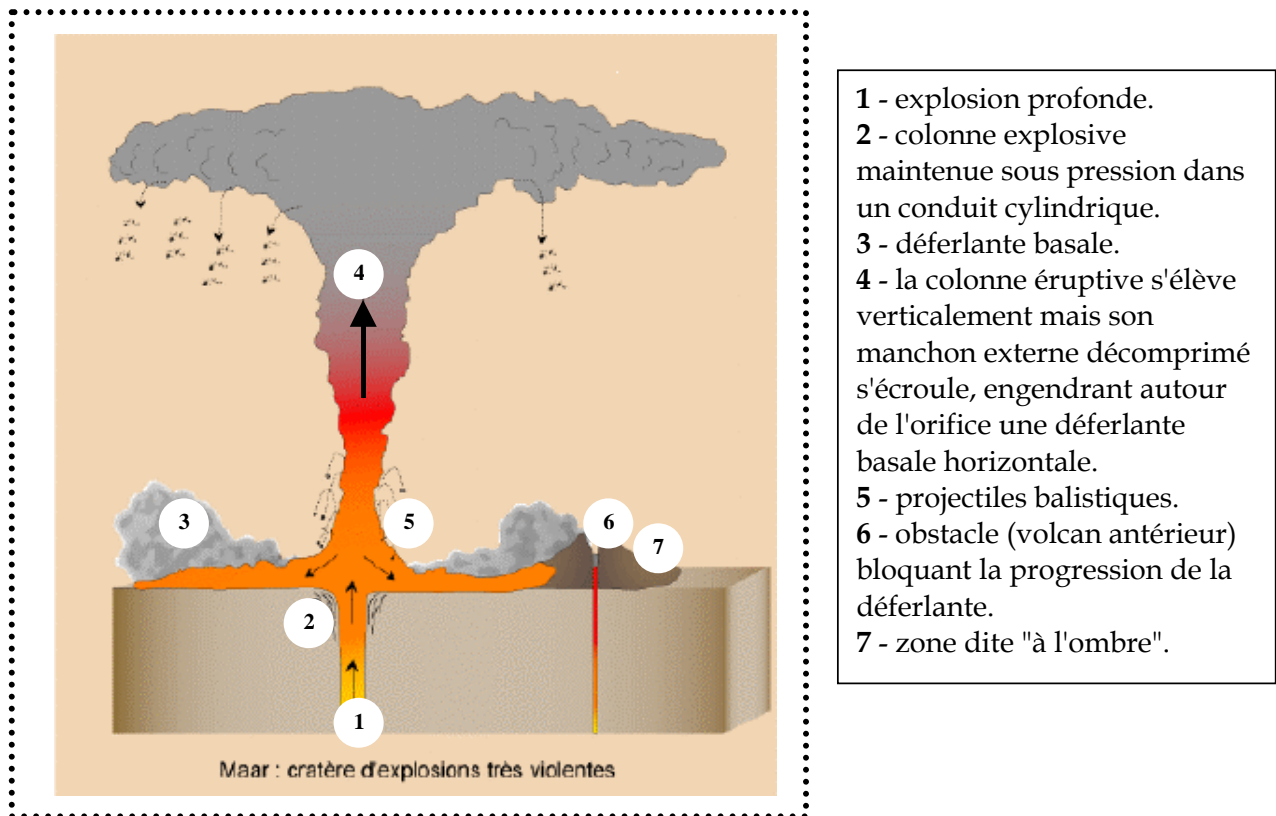


Figure P. 3 : Formation d'un cratère de maar

^{**} Gneiss : Roches de métamorphisme profond, issues de roches sédimentaires (grès).

^{††} Trachyandésite : communément appelée pierre de Volvic

II. LE LAC PAVIN : FORMATION GEOLOGIQUE , DONNEES MORPHOMETRIQUES ET HYDRODYNAMIQUES.



- Superficie : 44 ha
- Profondeur moyenne : 52 m
- Profondeur maximale : 92 m
- Creux du lac : 0,14
- Volume du lac : 22987000 m³
- Altitude : 1197 m
- Localisation : 45°55' N et 2°54' E

Le Lac Pavin occupe un cratère de 800 m de diamètre et de 92 m de profondeur maximale (52 m de profondeur moyenne). Les lèvres du cratère (Tuff-ring^{††}) s'élèvent à une trentaine de mètres au-dessus du lac, et sont boisées de pins, de hêtres et d'épicéas. La formation du Pavin résulte de la rencontre de magma et d'une nappe phréatique, entraînant la vaporisation explosive de l'eau (Figure P. 3). Ce phénomène conduit à la formation de cratères d'explosions circulaires de quelques centaines de mètres de diamètre et quelques dizaines de mètres de profondeur. Ces cratères sont généralement bordés par les produits des explosions qui comprennent des fragments arrachés du sous-sol et quelquefois du magma frais. Lorsque l'éruption cesse après la phase maar, un lac circulaire s'installe dans le cratère (Gour de Tazenat, Lac Pavin...).

L'origine phréato-magmatique du Lac Pavin lui confère des caractéristiques morphométriques particulières. Sa valeur de creux^{§§} (0,14) est la plus élevée des lacs du Massif Central (Lac Chauvet (0,09), Godivelle (0,12), Gour de Tazenat (0,11)). En conséquence, les brassages saisonniers n'affectent que la partie supérieure de la colonne d'eau (le mixolimnion (de 0 à 60m)), la partie profonde du lac (monimolimnion : 60 à 92m) n'étant jamais mélangée (Figure P. 4b). Cette originalité confère au Lac Pavin son caractère méromictique unique en France. Les mesures des teneurs en tritium effectuées entre 1965 et 1996 ont permis de confirmer l'existence d'une compartimentation particulière (Alvinerie *et al.* 1966, Camus *et al.* 1993, Schmid 1997). En effet, les concentrations en tritium ne sont pas uniformes sur l'ensemble de la colonne d'eau, les eaux profondes (60-90m) présentant des concentrations plus faibles (8 UT) que les couches superficielles (0-60m : 27UT).

^{††} Tuff-ring : Large cratère plat formé par une éruption phréatomagmatique

^{§§} Creux d'un lac= profondeur maximale/surface ^{1/2}

La compartimentation du lac est renforcée par la structure très fermée du bassin versant. Les parois externes du cratère sont recouvertes de forêt, ralentissant le "fetch"*** du vent. En conséquence, l'énergie de covariance est considérablement diminuée et l'action homogénéisante du vent n'est plus suffisante pour assurer le brassage intégral du lac. La stabilité du système est également renforcée par une densité plus grande des eaux du fond, obtenue par une forte augmentation de la salinité, en dépit de la légère remontée de température (plus d'un degré environ, Figure P. 4a).

Les volumes du mixolimnion et du monimolimnion sont respectivement de $18 \cdot 10^6$ et $5 \cdot 10^6$ m³ (**Viollier *et al.* 1997**). Le bilan hydrique étant négatif (entrées : 1700 m³.j⁻¹, sorties : 3700 m³.j⁻¹, **Viollier *et al.* 1997**, Tableau P. 1), certains auteurs ont suggéré l'existence de sources sous-lacustres (**Martin 1985**, **Camus *et al.* 1993**). Cependant, les arrivées de ces sources ne sont pas encore clairement identifiées. Considérant le contexte volcanique dans lequel se situe le Lac Pavin, il n'est pas exclu qu'une partie de ces apports sous lacustres soit de type eau minérale gazeuse (**Assayag 2003**).

Le temps de résidence des eaux du mixolimnion est estimé entre 8 et 10 ans (taux de renouvellement moyen de 0,09%.an⁻¹), 300 ans pour le monimolimnion (soit un taux de renouvellement moyen de 0,005%.an⁻¹, **Assayag 2003**). Ces données soulignent à nouveau la stabilité de la strate profonde.

	ENTREES			SORTIES	
	Précipitations	Sources, Ruissellements	Sources sous lacustres	Evaporation	Exutoire (Couze Pavin)
Viollier <i>et al.</i> 1997	18	12	23	8	45
Schmid 1997	20	33	10	8	55
Aeschbach-Hertig <i>et al.</i> 1999	-	23	35	-	-
Michard <i>et al.</i> (Données non publiées)	18	12	Dans le mixolimnion	8	45.2
			23		

Tableau P. 1. Bilan hydrique du Lac Pavin (en l.s⁻¹), établi par différents auteurs. Bilan hydrique= (Précipitations +Ruissellement+Infiltration)-(Evapotranspiration potentielle+exutoire).

*** Fetch : Course du vent, c'est à dire la distance parcourue par ce dernier sans rencontrer d'obstacles.

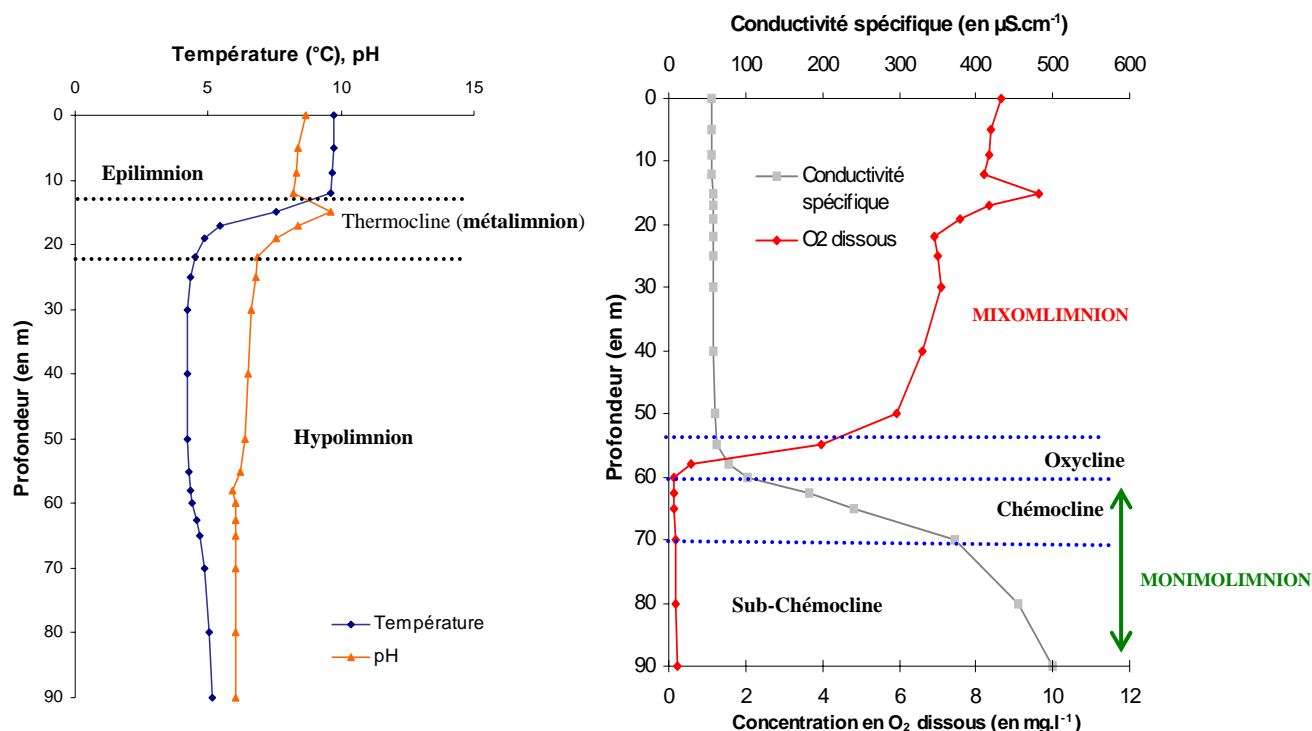


Figure P. 4: (a) Profil de température et de pH mesurée au point central du Lac Pavin en mai 2002 (Données de N. Assayag, 2003) indiquant les zones définies par la stratification thermique (épilimnion, thermocline, hypolimnion). (b) Profil d'oxygène dissous et de conductivité (normalisé à 20°C) définissant une stratification chimique (mixolimnion, chémocline, monimolimnion).

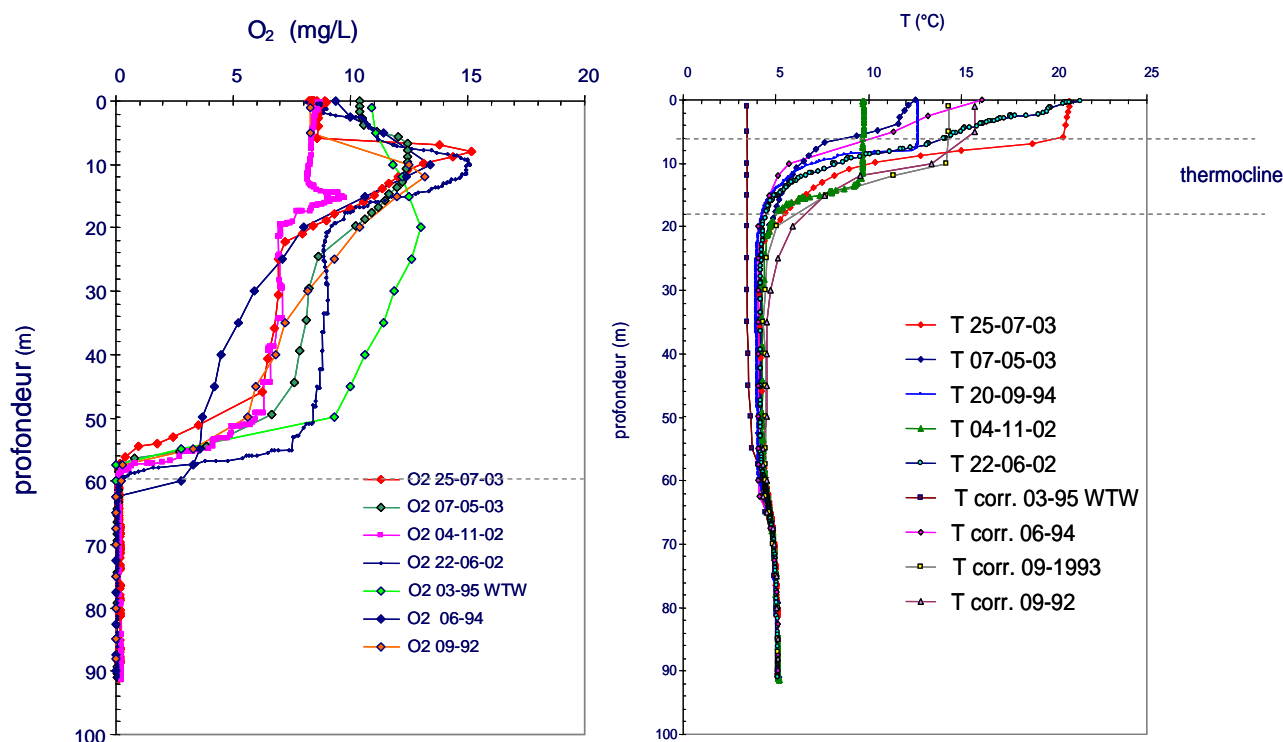


Figure P. 5. Evolution spatio-temporelle des concentrations en O₂ dissous (mg.l⁻¹) et de la température (°C). Données du laboratoire de Géochimie des Eaux, Paris VII.

III. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DELIMITANT LES DIFFERENTES STRATES DE LA COLONNE D'EAU.

Sur la base de critères physico-chimiques (Température, Conductivité, Oxygène dissous), la colonne d'eau du Lac Pavin peut être divisée en différentes strates (Figure P. 4 et P. 5).

Le profil de température définit trois zones : le métalimnion (ou thermocline^{†††}) qui délimite l'épilimnion (zone supérieure) et l'hypolimnion (entre 22 et 60 m). Cette dernière zone présente une température proche de la température de densité maximale de l'eau (4°C). Ces trois strates constituent le mixolimnion soumis aux brassages printanier et automnal (lac dimictique). Entre le mixolimnion et la zone profonde (sub-chémocline) est localisée la chémocline. Cette zone de transition est marquée par un fort gradient de densité s'opposant aux phénomènes de brassages verticaux, mais favorisant cependant les mélanges horizontaux. L'ensemble des mesures réalisées depuis 1964 révèle de faibles variations de la localisation de cette zone (**Alvinerie *et al.* 1966, Pelletier 1968, Michard *et al.* Données non publiées**). La légère augmentation de la température observée dans le monimolimnion résulte du flux géothermique diffusant dans ce milieu "confiné". Le profil des concentrations en oxygène dissous révèle un monimolimnion (<60 m) totalement anoxique. Ce dernier n'étant jamais soumis au brassage saisonnier, il constitue donc une zone anoxique permanente.

IV. EVOLUTION TEMPORELLE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU MONIMOLIMNION: HYPOTHESE DU "STEADY STATE".

Le mixolimnion est sujet aux contraintes de forçage météorologiques, et les fluctuations de la température et de l'intensité lumineuse contraignent la production primaire qui a son tour conduit à une augmentation du pH et de la concentration en O₂ dissous. D'autre part des variations de l'activité photosynthétique impliquent des évolutions saisonnières des concentrations en nitrates (NO₃⁻), silice (SiO₂), et phosphates. Par opposition, le monimolimnion est un milieu "confiné", isolé des contacts avec l'atmosphère. Cet écosystème très particulier a très précocement attiré l'attention des scientifiques. Les premières analyses physico-chimiques de la colonne d'eau du Lac Pavin ont été réalisées en 1892 par **Duparc et Delebecque (Delebecque 1898, Olivier 1939, 1952)**. Depuis de nombreux auteurs se sont intéressés à l'origine et à l'évolution du monimolimnion de ce lac (**Pelletier 1968, Meybeck *et al.* 1975, Michard *et al.* 1994, Viollier *et al.* 1995, 1997, Aeschbach-Hertig 1999**). Trente années de données géochimiques et physico-chimiques, acquises notamment par le Laboratoire de Géochimie des Eaux (LGE, Paris VII, **Michard *et al.* Données non publiées**),

^{†††} Thermocline : plan horizontal présentant le plus fort gradient de température

révèlent que cette strate profonde présente une composition constante d'une année sur l'autre. Ainsi les variations spatio-temporelles des paramètres physiques (température, pH, alcalinité, conductivité...) et des concentrations en éléments conservatifs (ex : Na, Cl) ou réactifs (ex : Fe, Mn) sont très faibles à l'échelle du mètre. Ces observations suggèrent que le monimolimnion du Lac Pavin est en état stationnaire ou état de "steady state" (**Aeschbag-Hertig *et al.* 1999, Michard *et al.* Données non publiées**).

V. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU MONIMOLIMNION DU LAC PAVIN.

De nombreuses données physico-chimiques et géochimiques sur le monimolimnion du Lac Pavin sont accessibles. Cependant, les données biologiques sont, à notre connaissance, réduites à deux études : **Champiat 1976**, et, **Amblard et Restituto 1983** qui se sont essentiellement concentrées sur l'origine biogénique et/ou tellurique de l'H₂S présent au niveau de la chémocline. Un suivi spatio-temporel des densités bactériennes (dénombrement en milieu liquide et dosage des nucléotides adényliques) par Champiat (1976) a révélé que ces dernières étaient inférieures à 10³ cellules.ml⁻¹ dans la zone anoxique (à l'exception des mois de août et septembre, pour lesquels les densités sont proches de 10⁶). Cet auteur observe également que les bactéries sulfato-réductrices "sont inexistantes ou en très faibles quantités" (les densités observées ne dépassaient pas 10² cell.ml⁻¹), et conclue donc à une origine tellurique de l'H₂S.

En **1983, Amblard et Restituto** observent une évolution importante des concentrations en nucléotides adényliques entre -56 m et -62 m (zone de concentration maximale en H₂S) qui n'apparaissent pas liées au développement algal. Ces auteurs émettent l'hypothèse d'un développement préférentiel, dans cette zone, de populations bactériennes, et suggèrent ainsi que l'H₂S du Lac Pavin est lié pour partie à un métabolisme bactérien non photosynthétique.

Depuis ces deux études, le "mystère" des communautés microbiennes de la zone anoxique du Lac Pavin est resté entier. L'évolution des outils microbiologiques et moléculaires peut actuellement permettre de caractériser plus précisément la structure, l'abondance, la diversité de ces populations anaérobies. D'autre part, l'éventail de données physico-chimiques et géochimiques acquises par différentes équipes, notamment par le LGE, permet d'émettre un certain nombre d'hypothèses quant à l'implication de la fraction procaryotique dans les cycles biogéochimiques de cet écosystème.

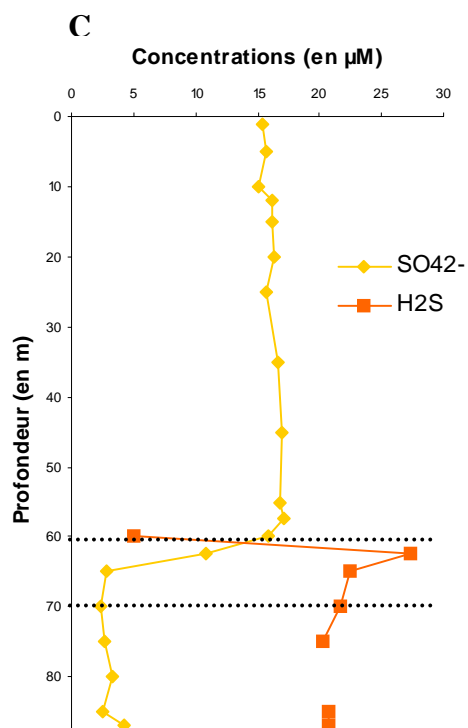


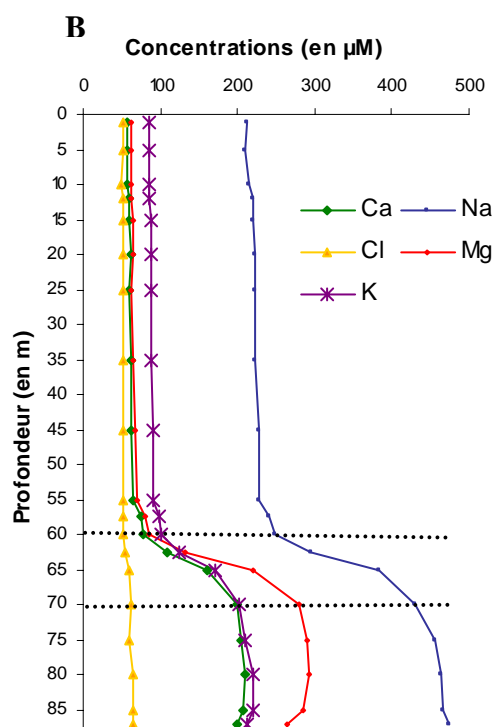
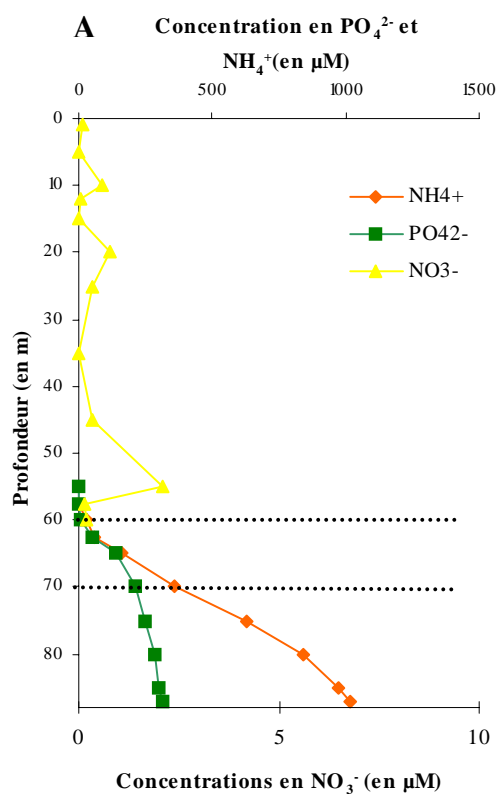
Figure P.6: Concentrations d'éléments dissous majoritaires (en μM).

A- Concentrations en formes réactives d'ammonium et phosphate

B- Concentrations en calcium, potassium, chlore, sodium (en μM)

C- Concentrations en sulfates et hydrogène sulfuré (en μM).

Données du Laboratoire de Géochimie des Eaux (Paris VII), Michard *et al.* Données non publiées. Les barres horizontales délimitent la chimocline.



L'étude des communautés microbiennes anaérobies a été conduite dans cette étude sur le monimolimnion du Lac Pavin. Aussi, la section suivante sera essentiellement consacrée aux caractéristiques de cette zone.

VI. COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DU MONIMOLIMNION ET HYPOTHESES SUR LES CYCLES BIOGEOCHIMIQUES.

Compte tenu de l'hypothèse de "steady state" proposée par l'Equipe du LGE, nous avons considéré que l'évolution temporelle des différents paramètres physico-chimiques du monimolimnion était très faible. Les hypothèses sur l'implication de la fraction procaryotique dans les cycles biogéochimiques, qui ont guidé notre étude, s'appuient sur des données acquises par cette équipe et antérieures à notre étude.

Les différents profils présentés ci-dessous ont été établis à partir de données du LGE. Cette équipe a décrit de façon quasi exhaustive l'évolution des éléments majoritaires et des éléments traces dans cette zone profonde (30 années d'étude), cependant ne seront repris ici que les données relatives aux éléments d'intérêt pour le travail conduit sur les communautés microbiennes anaérobies.

VI.A. Evolution verticale des éléments inorganiques dissous majoritaires.

La transition entre la couche supérieure et la zone profonde (monimolimnion) située vers 60 m se caractérise par une brusque variation des caractéristiques physico-chimiques. En traversant la chémocline, la concentration des composés à l'état réduit augmente : Fe^{2+} , Mn^{2+} , sulfures, ammonium, mais également les composés alcalins^{##} et alcalino-terreux^{\$\$\$} et plus généralement de tous les éléments, y compris ceux à l'état de traces (**Michard *et al.* Données non publiées**) ; parallèlement, les composés oxydés (O_2 , sulfate, nitrate, antimoine) disparaissent (Figure P. 6).

✚ **N et P** (Figure P. 6. A) : Les concentrations en ammonium et phosphate sont élevées dans le monimolimnion suggérant que ces éléments ne sont pas des facteurs limitant la croissance microbienne. L'enrichissement en ammonium dans le monimolimnion pourrait être attribué aux processus de dénitrification et d'ammonification. Le diagramme de mélange (**Michard *et al.* données non publiées**) met en évidence que cet élément n'est pas conservatif mais est consommé dans ce monimolimnion. Les concentrations en azote moléculaire (Figure P.13) augmentent également dans cette zone mais les nitrates et nitrites en sont absents. La distribution du phosphore est particulièrement influencée par le cycle du fer, en effet, les oxydes de fer se

^{##} Alcalins : élément chimique de la première colonne du tableau périodique des éléments (ex : Na, P)

^{\$\$\$} Alcalino-terreux : élément chimique de la seconde colonne du tableau périodique des éléments (ex : Mg, Ca)

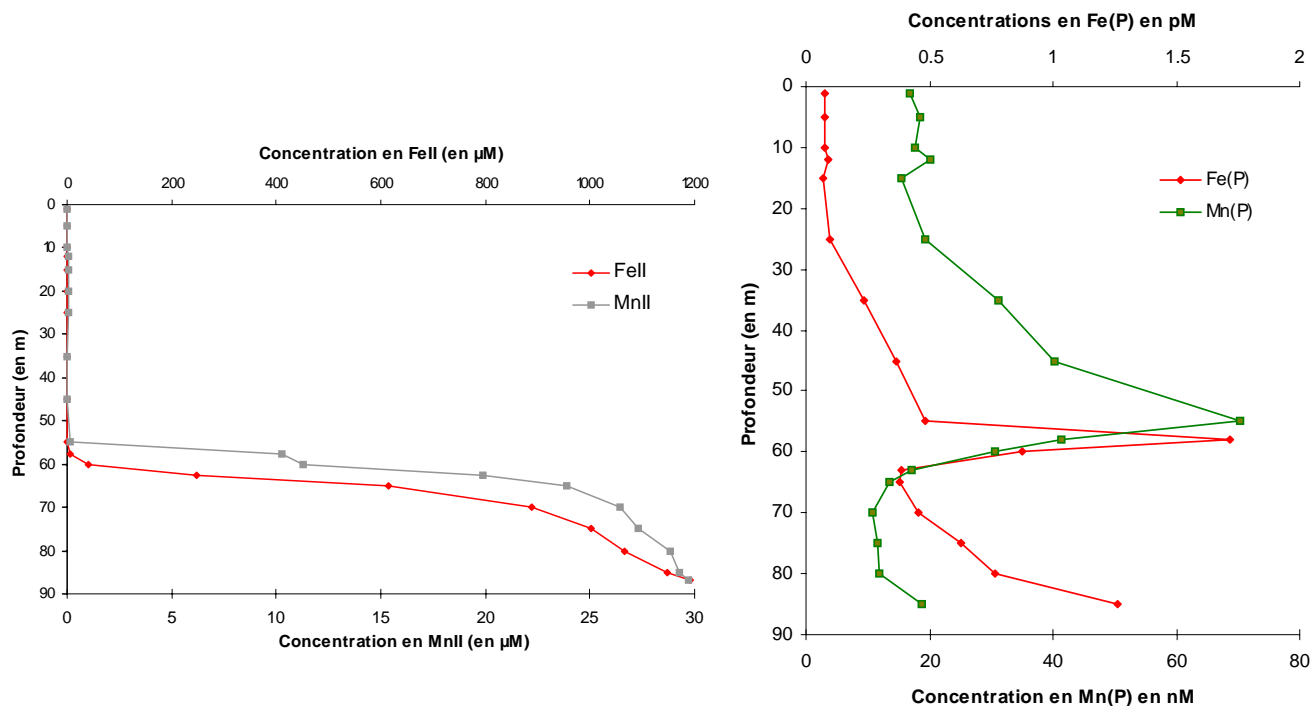


Figure P.7: Evolution des concentrations en Fer et Manganèse dissous (A) et dans la phase particulaire (B) (la limite entre particulaire et dissous est conventionnellement $0,45\mu\text{m}$). Données du Laboratoire de Géochimie des Eaux Paris VII).

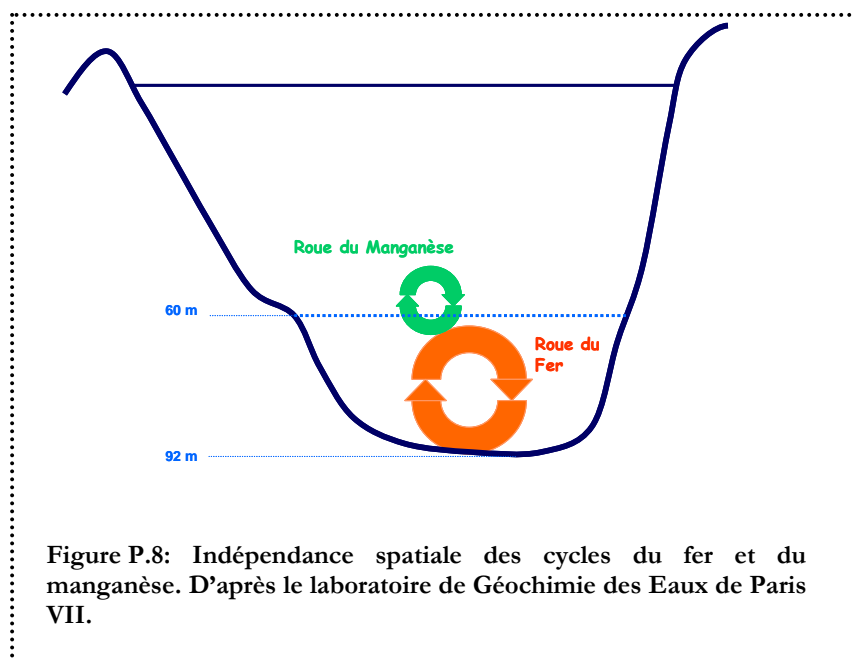


Figure P.8: Indépendance spatiale des cycles du fer et du manganèse. D'après le laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII.

complexent avec le phosphate (protovivianite) et conduisent ainsi à une séquestration du phosphore dans les eaux profondes.

■ **Fe et Mn** (Figure P.7): La forte réactivité du fer rend la chimie de cet élément complexe. Le cycle du fer, dénommé "roue du fer", est composé de deux étapes principales : oxydation en Fe(III) et réduction en Fe(II). Les fortes concentrations en Fe(II) dissous dans le monimolimnion entraînent une diffusion de ce composé vers le mixolimnion. En présence d'O₂, l'oxydation du fer est très rapide, et le Fe(II) est complètement oxydé avant d'atteindre 55 m. Le fer oxydé (Fe(III)) sous forme particulaire précipite alors dans le monimolimnion où il sera à nouveau réduit en Fe(II). Les oxydes de fer formés au dessus de la chémocline se complexent avec le phosphore conduisant à une transformation partielle en protovivianite. Cette seconde espèce est dissoute au niveau de l'interface eau-sédiment, pour former des oxyhydroxydes ferriques et de la pyrite (FeS₂). Ainsi, dans le lac Pavin, le fer particulaire est essentiellement présent sous forme d'oxyde de Fe(III) à 55 m, de phosphate de Fer (protovivianite) et de pyrite à 85 m et dans le sédiment (**Michard *et al.* Données non publiées**).

Si des similarités entre le cycle du fer et du manganèse ont été notées depuis longtemps (**Stumm et Moris 1967, Michard 1971**), c'est au niveau de la transition zone oxydée/zone anoxique que s'expriment des différences entre le comportement de ces deux composés (Figure P. 8). En effet, le manganèse présente des cinétiques d'oxydation et de réduction inverses de celles du fer. L'oxydation du fer est très rapide alors que celle du manganèse est lente (le Mn est oxydé au dessus de 55 m). Par opposition, la réduction du manganèse en condition anoxique est rapide, celle du fer est lente. Le fer particulaire présente ainsi de fortes concentrations à 57,5 m (juste au dessus de l'interface oxydée/anoxique), le manganèse particulaire exhibe quant à lui des concentrations maximales à 55 m. L'indépendance des phases solides du Mn et du Fe a été observée par **Fortier (1993)** et par **Michard *et al.* (Données non publiées)**.

D'autre part l'observation, à ces profondeurs, d'agrégats bactériens, suggère l'implication d'une fraction bactérienne dans l'oxydation du Fe(II) et du Mn(II) (**Jaquet *et al.* 1982**). Au vu des des modélisations réalisées par le LGE, les fortes concentrations en Fe(II) observées dans le monimolimnion (>1mM), Figure P.7, ne peuvent pas être expliquées par les seuls processus géochimiques. D'autre part, le Fe(III) étant l'oxydant majeur du monimolimnion, l'implication de cet élément dans des processus biogéniques apparaît réaliste (Figure P.9).

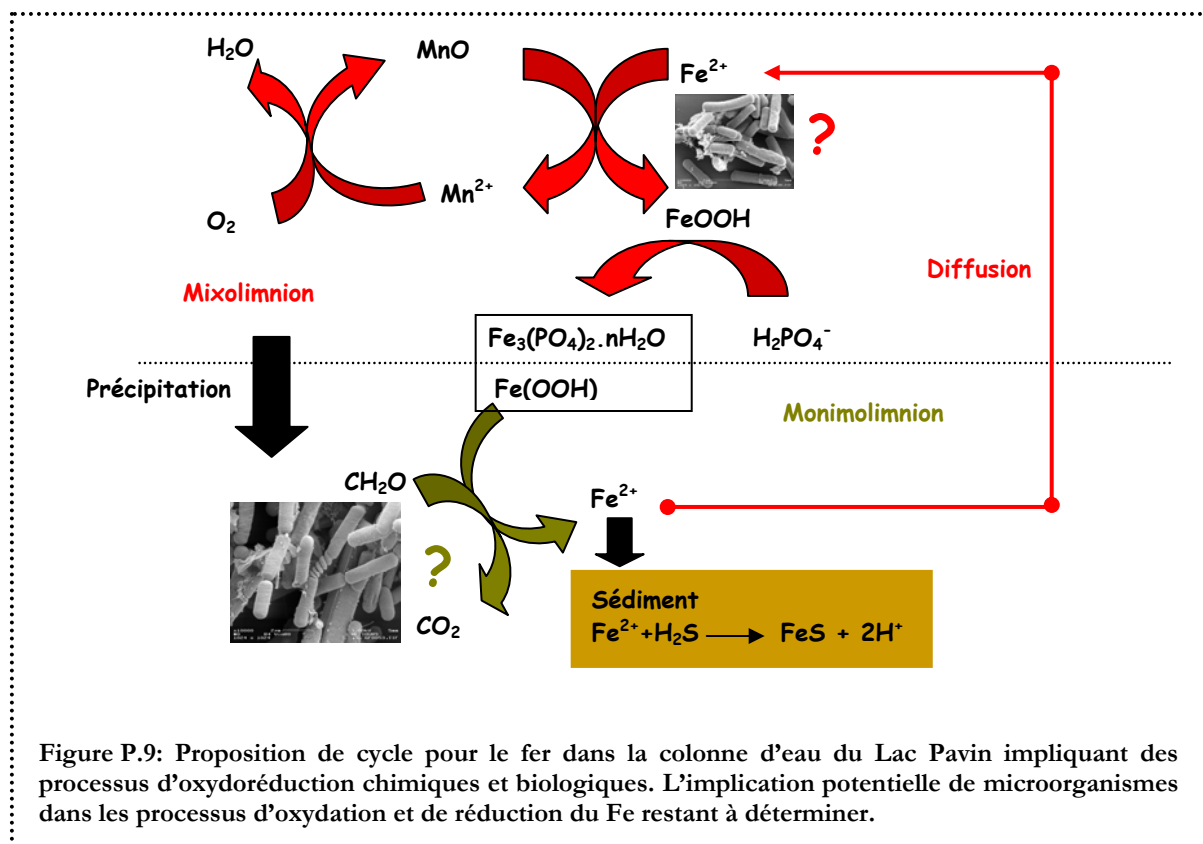


Figure P.9: Proposition de cycle pour le fer dans la colonne d'eau du Lac Pavin impliquant des processus d'oxydoréduction chimiques et biologiques. L'implication potentielle de microorganismes dans les processus d'oxydation et de réduction du Fe restant à déterminer.

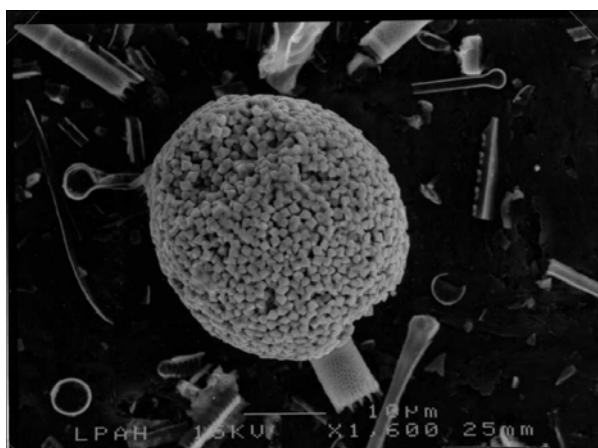


Figure P.10: Framboïde de pyrite observée dans les sédiments du Lac Pavin. Photo Laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII.

■ **S** (Figure P.6): La détermination de l'origine de la couche d'H₂S présente au niveau de la chémocline a suscité l'intérêt des géochimistes aussi bien que des biologistes. Dans le mixolimnion, la concentration des ions sulfate qui représentent la seule espèce soufrée varie entre 15 et 17 μM (**Michard et al. Données non publiées**). Une disparition des ions sulfates concomitante à une augmentation des concentrations en H₂S est observée dans la chémocline. Des concentrations maximales en thiosulfate (S₂O₃²⁻), métabolite intermédiaire dans le processus de sulfato-réduction, ont également été notées dans cette chémocline (**Millero 1991**). Ces observations complémentaires vont dans le sens des hypothèses de **Amblard et Restituto (1983)** suggérant une implication de microorganismes sulfato-réducteurs dans la production d'H₂S dans le monimolimnion du Lac Pavin. Le soufre est également présent sous forme particulière dans cette zone profonde. En effet, des analyses en microscopie électronique à balayage (Figure P.10, **Michard et al. Données non publiées**) révèlent des quantités importantes de framboïdes de pyrite (FeS₂).

VI.B. Carbone Organique Total, Carbone Inorganique Total dissous, CO₂, CH₄

Dans le mixolimnion, les concentrations en Carbone Organique Dissous (COD^{****}, Figure P.11) déterminées par **Viollier et al. 1995**) sont faibles (15 à 80 μM), typiques d'un lac oligomésotrophe (**Thurman 1985**). Ces concentrations augmentent dans le monimolimnion (>360 μM), et, contrairement aux autres éléments majeurs dissous, le gradient de COD n'est pas présent dans la chémocline mais à l'interface eau/sédiment (zone néphéloïde). Le diagramme de mélange (Figure P.12) révèle que ce COD est consommé dans le monimolimnion (consommation, complexation, agglomération). Si les concentrations élevées en COD dans le monimolimnion, suggèrent que ce dernier n'est pas limitant pour l'activité des communautés microbiennes, la composition de cette fraction carbonée reste néanmoins inconnue.

L'absence de brassage du monimolimnion conduit à une accumulation de CO₂ (produit final de la dégradation de la MO, Figure P.13). En conséquence, les concentrations en Carbone Inorganique Total Dissous^{†††} (CITD) augmentent à partir de 60 m (Figure P.15). **Aeschbag-Hertig et al. (1999)** estiment que 78% du CO₂ serait d'origine magmatique (11.5 mmol.l⁻¹ soit 50.10⁶ moles au total). Une datation au carbone 14 réalisée en juin 1998 révèle une activité de 36% en carbone moderne (**Assayag 2003**). La modélisation (logiciel AQUASIM) permet d'estimer que 1/3 du carbone serait d'origine biogénique, 2/3 d'origine magmatique (**Assayag 2003**). L'accumulation de gaz carbonique d'origine biogénique ou endogène dans le monimolimnion du Lac Pavin peut soulever un certain nombre de questions quand à un risque potentiel d'éruption gazeuse. En effet,

**** COD : carbone lié aux molécules organiques dont la taille est inférieure au seuil de coupure du filtre utilisé (en général 0.45 ou 0.22 μm)

††† CITD = (H₂CO₃) + (HCO₃⁻) + (CO₃²⁻)

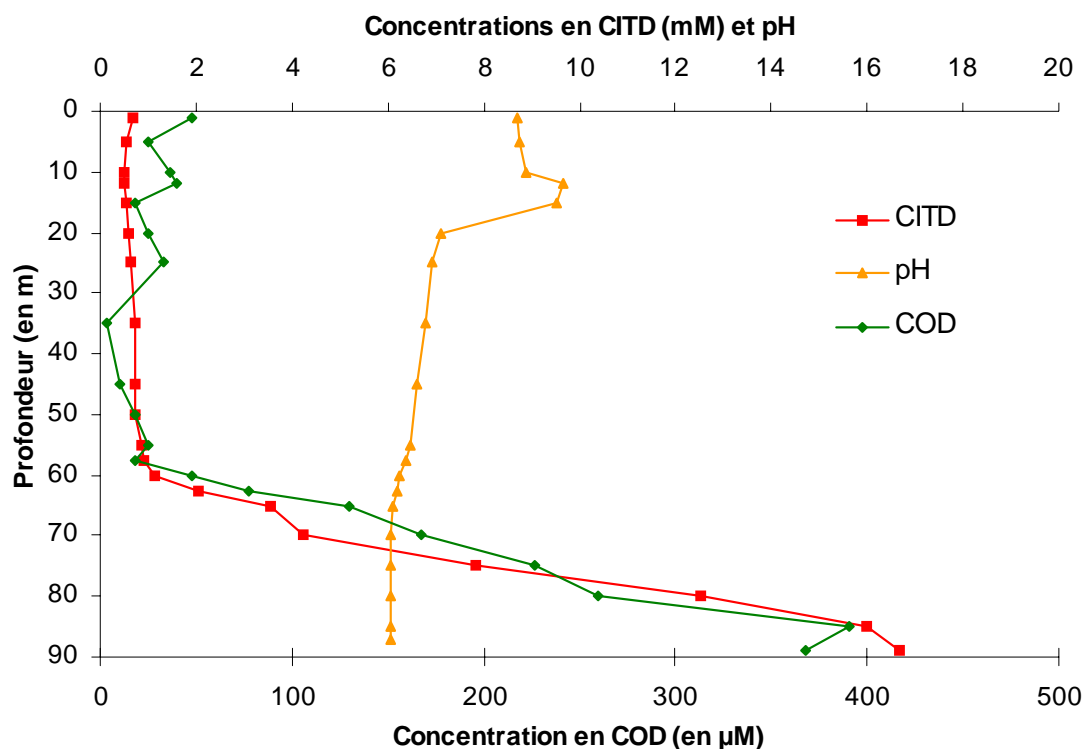


Figure P.11 : Profils des concentrations en Carbone Organique Dissous (COD), Carbone Inorganique Total Dissous (CITD).

$\text{COD} = \text{COTD} - \text{CITD}$

(COTD = Carbone organique total dissous).

Les concentrations sont exprimées en μM pour le COD, en mM pour le CITD.

Les mesures de COD sont issues de la publication de Viollier *et al.* 1995, celles de CITD ont été réalisées par N. Assayag 2003.

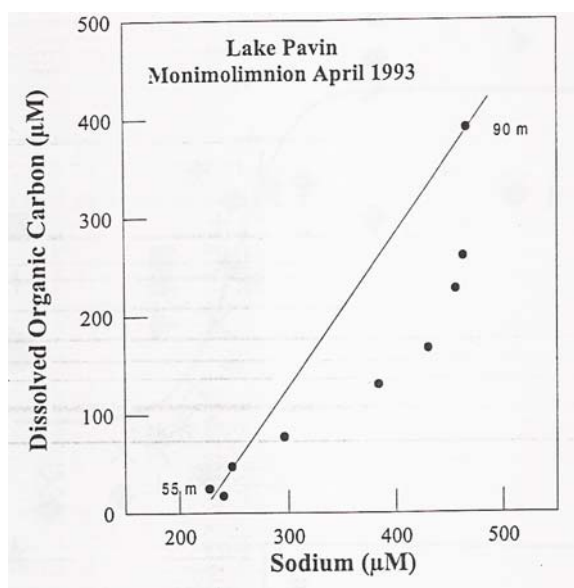


Figure P.12: COD *versus* sodium (élément conservatif) dans le monimolimnion. Ce diagramme permet de voir si les éléments sont impliqués dans des réactions chimiques. D'après Viollier *et al.* (1995).

à la suite des catastrophes de 1979 (Indonésie) et de 1984 et 1986 (Lac Monoum et Nyos, Cameroun), "le phénomène d'éruption gazeuse carbonique est devenu un risque naturel mortel à prendre en considération " (Camus *et al.* 1993). Cependant, la pression totale de gaz (CH_4 , CO_2 , N_2) à 85 m est estimée à 3,0 bars par Schmid (1997). Les valeurs correspondantes à 70 m sont respectivement de 2,3 et 2,2 bars. Ces pressions sont trop faibles pour envisager un risque imminent de dégazage spontané (le CO_2 commence à dégazer à une pression de 10 bars, pression qui sera atteinte dans 400 000 ans, Assayag 2003). Néanmoins, le risque d'explosion hydrothermale (libération brutale de CO_2 résultante d'une ouverture accidentelle (forage) ou naturelle (activité sismique) du gisement, ex : éruption de Dieng 1979) et le risque volcanique (ex : Lac Nyos 1986) ne sont pas exclus (Assayag 2003).

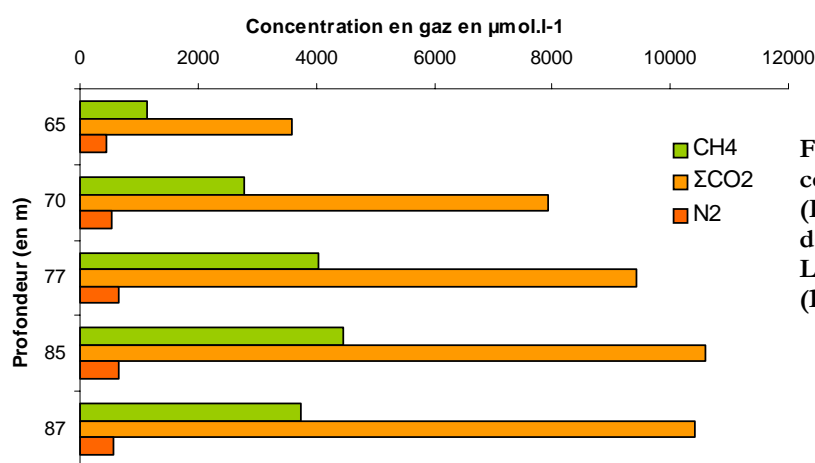


Figure P.13: Evolution des concentrations en CO_2 (H_2CO_3) + (HCO_3^-) + (CO_3^{2-}), CH_4 et N_2 dans la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin. D'après Michard *et al.* (Données non publiées)

Afin de retracer les processus physico-chimiques et de discriminer les sources de carbone, les équipes du LGE et du LGIS (Paris VII/IPGP, Assayag 2003) ont couplé, les analyses de CTD et des mesures isotopiques^{***} du carbone (Figure P.14, P.15). Les profils $\delta^{13}\text{C}$ de novembre et de mai (Figure P.15) sont parfaitement superposables dans le monimolimnion du Lac Pavin suggérant que cette zone profonde n'est pas affectée par les variations saisonnières observables dans la partie supérieure du lac. L'activité photosynthétique (0-20 m) plus intense en mai conduit à un enrichissement de l'eau en ^{13}C par rapport à novembre. Entre 20 et 60 m les processus biologiques sont dominés par l'activité de dégradation de la matière organique conduisant à un appauvrissement en ^{13}C .

*** Isotopes= Eléments chimiques possédant le même nombre de protons (même numéro atomique) mais un nombre de neutrons différents (masse atomique différente).

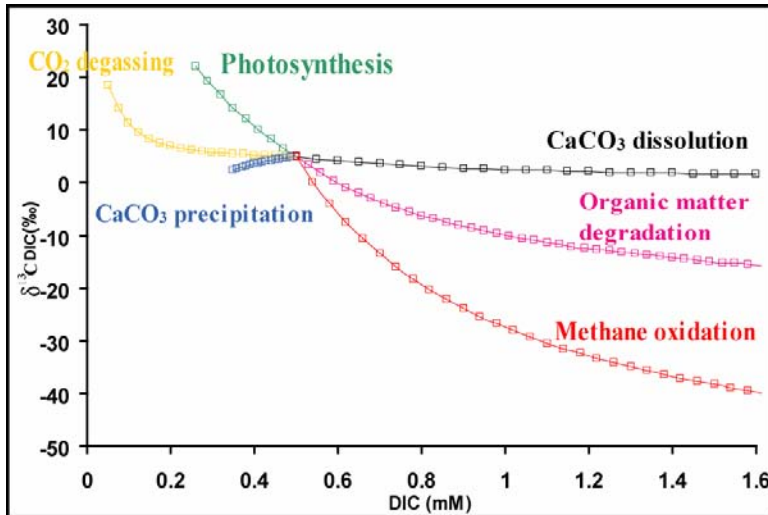


Figure P.14 : Exemples de processus conditionnant un fractionnement isotopique du carbone. D'après Assayag (2003).

Le Carbone inorganique issu de la photosynthèse présente un enrichissement en ^{13}C , au contraire le carbone issu de la réoxydation du méthane est fortement appauvri en ^{13}C

Figure P.15 : Profils $\delta^{13}\text{C}$ (en ‰) en fonction de la profondeur. Données de Nelly Assayag (2003)

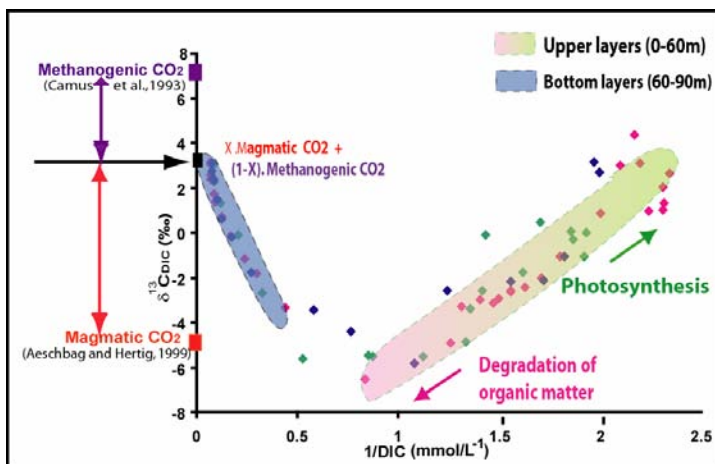
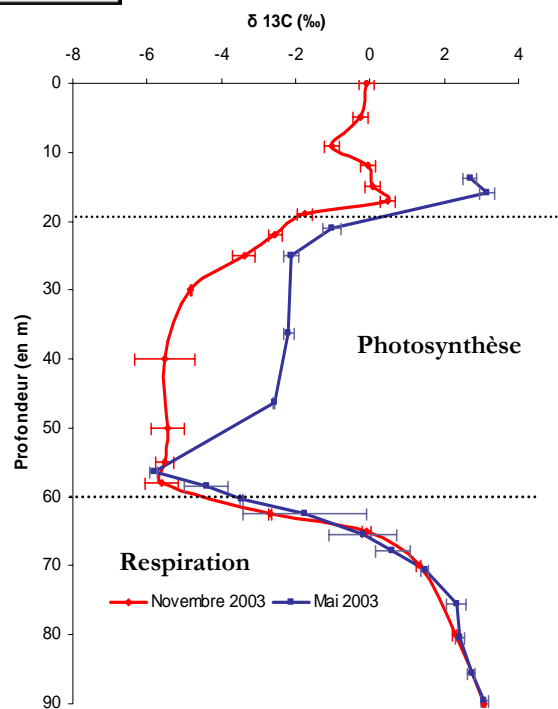


Figure P.16 : $\delta^{13}\text{C}$ vs CIT. D'après N. Assayag 2003

La détermination du rapport $\delta^{13}\text{C} = f(1/\text{CITD})$ permet de visualiser les mélanges au sein du lac (Figure P.16). Il apparaît que les profondeurs localisées à 58 m et entre 67,5 et 70 m présentent des $\delta^{13}\text{C}$ (CITD) plus faibles que les autres profondeurs car ces points sont plus éloignés du modèle théorique (Assayag 2003). Une hypothèse pouvant expliquer cet appauvrissement en ^{13}C serait l'existence d'un processus d'oxydation anaérobie du CH_4 (l'oxydation de ce composé conduisant à un $\delta^{13}\text{C}$ très appauvri). Cette hypothèse est renforcée par l'observation des profils CH_4 . Si l'accumulation de CH_4 dans la zone anoxique suggère que la méthanogénèse est un processus biogénique dominant (Figure P. 13), cet élément n'apparaît pas cependant pas inerte dans cette zone. En effet, le diagramme de mélange $\text{CH}_4 = f(\text{Na})$ révèle deux ruptures de pentes : une située à une profondeur de 58 m, la seconde entre 67,5 et 70 m (Figure P.17). Ces ruptures de pente indiquent que le méthane est consommé dans cette zone anoxique et sont bien corrélées avec l'appauvrissement en $\delta^{13}\text{C}$ observé à ces profondeurs (Assayag 2003).

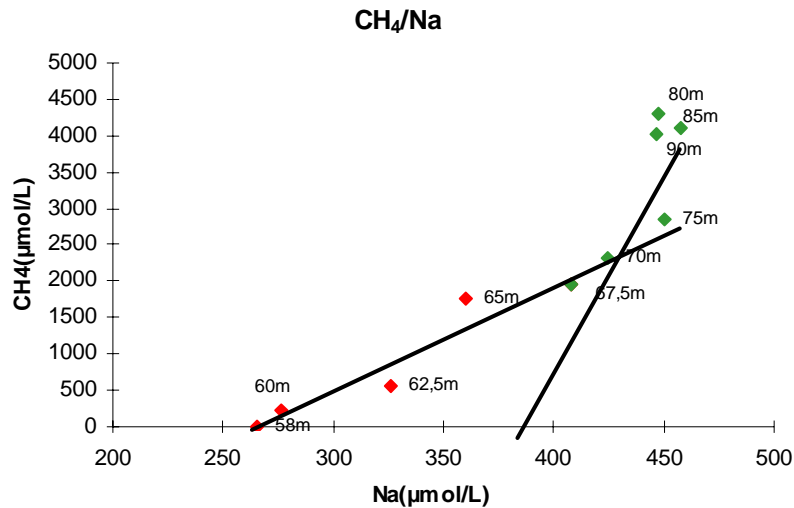


Figure P.17 : Profil $\text{CH}_4 = f(\text{Na})$. Les ruptures de pente révèlent que le méthane ne se comporte pas comme un élément conservatif dans la zone anoxique du Lac Pavin. D'après N. Assayag, 2003

II^{EME} PARTIE : LE LAC D'AYDAT

Le lac d'Aydat se situe à 25 km au sud-ouest de Clermont-Ferrand dans la partie méridionale de la chaîne des Puys ([Figure P.19](#)), à 825 m d'altitude. Il est alimenté dans la partie sud-ouest par la rivière Veyre qui prend sa source à 7 km en amont du plan d'eau. La surface du lac est de 60,3 ha, son volume de $4,2 \times 10^6 \text{ m}^3$, sa profondeur moyenne de 7 m avec un maximum de 15,5 m ([Figure P.18](#)). Le couvert végétal caractérise la géologie des terrains : les terrains granitiques et les formations volcaniques anciennes du Mont-Dore sont essentiellement recouvertes de prairies, alors que les formations volcaniques récentes de la chaîne des Puys sont boisées (hêtres, résineux). Ces dernières passent progressivement à des landes dans la partie nord du bassin, au voisinage du Puy de la Vache. L'activité humaine autour du lac est essentiellement agricole avec une très nette prédominance de l'élevage en amont du lac. A cela s'ajoute le tourisme, relativement bien développé en période estivale avec l'aménagement d'une base de loisirs sur la rive ouest (**Philippe 1989, Ogier 1999**)

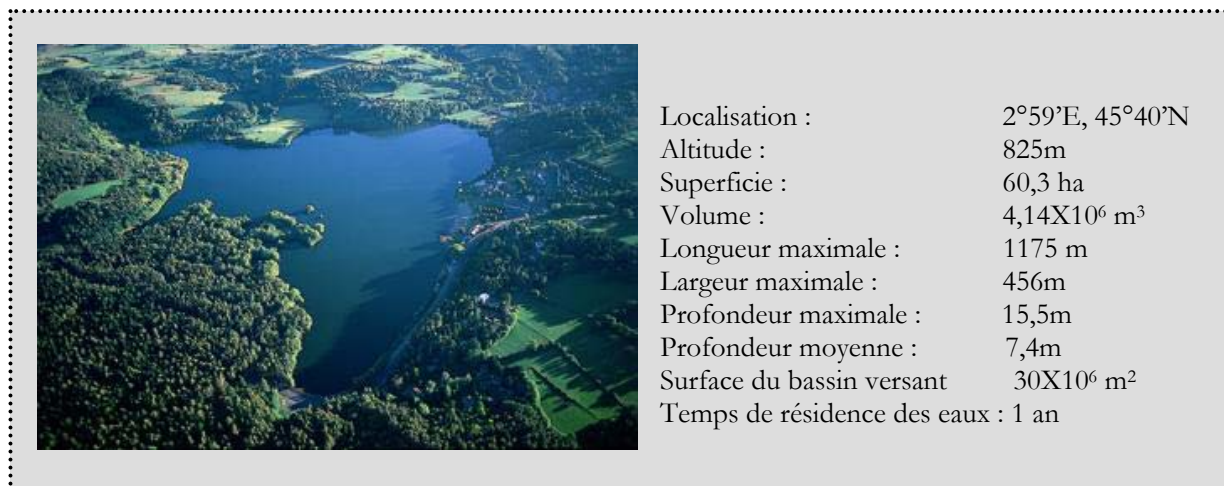
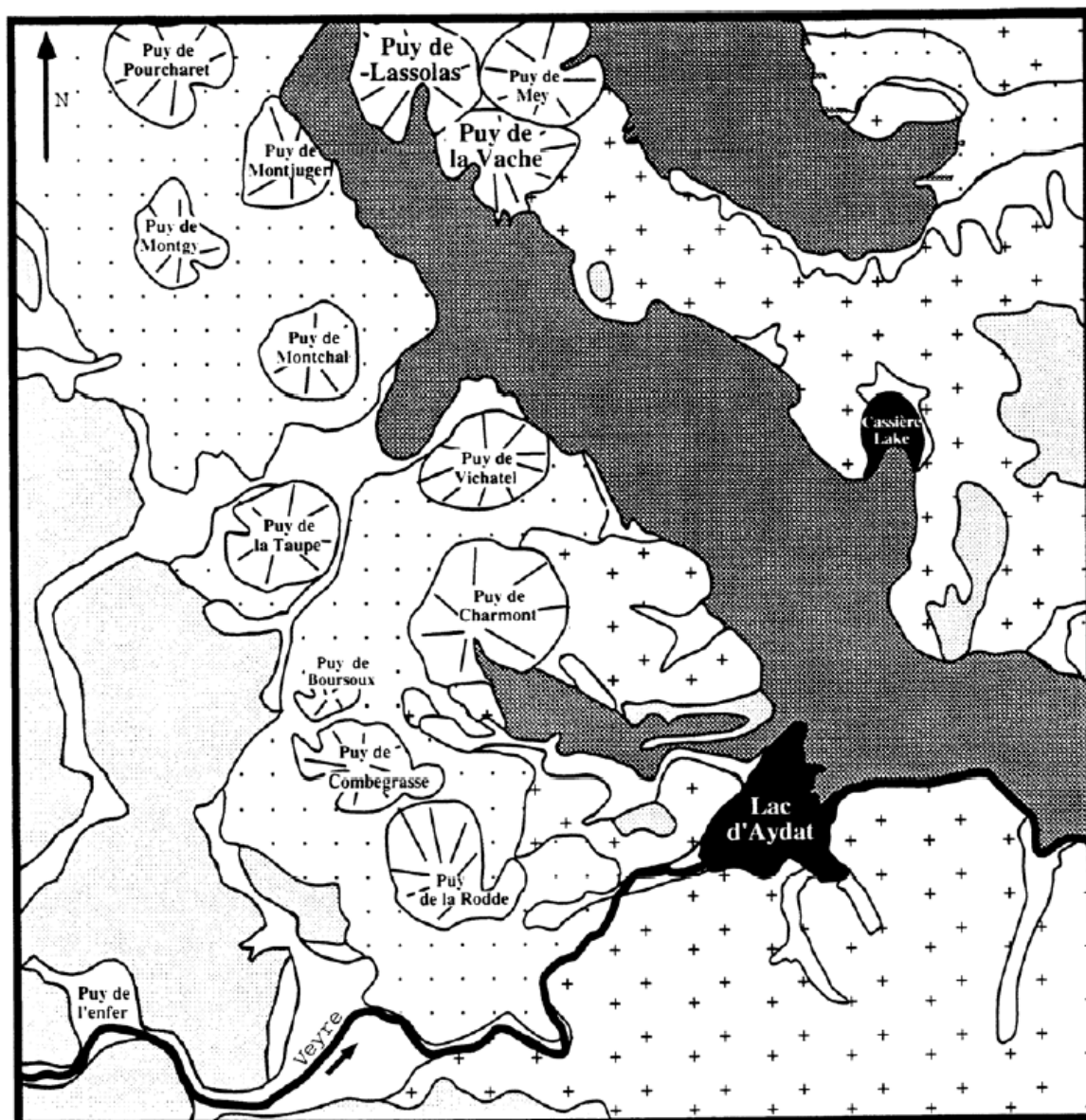


Figure P.18 : Principales caractéristiques morphométriques du lac d'Aydat

I. CONTEXTE GEOLOGIQUE

Le lac d'Aydat doit son origine au barrage naturel de la vallée de la Veyre par une coulée de lave issue de l'éruption des volcans jumeaux de la Vache et de Lassolas. L'âge de cette coulée a été estimé à 7650 ans BP ± 350 (**Bouchet, 1987**). Le lac repose sur un substratum cristallin imperméable de granodiorite. Il est limité par les basaltes de la Cheyre de la Vache et de Lassolas dans sa partie orientale et par des granodiorite dans sa partie méridionale et occidentale ([Figure P.19](#)). La Veyre transite essentiellement sur des roches volcaniques puis sur le socle granodioritique, en fin de parcours, avant d'atteindre le lac. Les laves présentes sur le bassin sont



1/50 000







-  Formations superficielles : colluvions et alluvions récentes
-  Cônes volcaniques
-  Volcanisme avant la mise en place de la Chaîne des Puys (Mio-Pliocene)
-  Brèches pyroclastiques
-  Socle plutonique et métamorphique
-  Laves basaltiques et leucobasaltiques (7500 BP + 350 ans)

Figure P.19 : Carte géologique du bassin versant du Lac d'Aydat, extrait de la carte géologique au 1/50000 de Veyre-Monton. D'après Ogier 1999

majoritairement des basaltes qui sont des laves massives, gris foncé à noir, caractérisées macroscopiquement par des phénocristaux de clinopyroxène¹ et d'olivine² auxquels peuvent s'ajouter du labrador et de la titanomagnétite. Le basalte de la Cheyre d'Aydat contient également des feldspathoïdes (néphéline, sodalite) ainsi que la sanidine (**Bouchet 1987**).

II. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES EAUX.

Les études de la composition chimique de la masse d'eau du Lac d'Aydat réalisées par le LGE montrent que le lac d'Aydat est typiquement eutrophe et développe d'avril à octobre un hypolimnion anoxique. Les résultats de la campagne menée en 1996 (**Ogier 1999**) soulignent que le maximum de stratification des eaux était atteint en août avec une oxycline localisée à 5 m de profondeur. Cette stratification s'affaiblissant en octobre quand les températures sont plus froides, pour disparaître complètement en novembre lors du retournement des eaux du lac. Toute la colonne d'eau est alors oxygénée. Les profils de concentrations de O₂, pH, TCO₂, NH₄, TPO₄, Fe²⁺, Mn²⁺, et SO₄²⁻, dans les eaux stratifiées du lac, montrent combien l'hypolimnion et l'épilimnion, séparés par la thermocline, sont antinomiques du point de vue de leur composition chimique (Figure P.20). L'oxygène est en excès dans les eaux de surface tandis qu'il disparaît totalement dans l'hypolimnion suite à son utilisation lors des processus de minéralisation. Le pH qui est élevé dans l'épilimnion et faible dans l'hypolimnion, reflète l'activité biologique. L'augmentation avec la profondeur des concentrations en TCO₂, NH₄, et TPO₄ traduit également les réactions de minéralisation de la MO. Les profils de Fe²⁺ et de Mn²⁺ représentent la dissolution réductrice des oxydes (Fe(OH)₃ et MnO_x) dans les sédiments de fond et la diffusion des espèces réduites Fe²⁺ et Mn²⁺ dans l'hypolimnion anoxique, tandis que SO₄²⁻ est utilisé par les bactéries sulfato-réductrices (**Ogier 1999**).

III. HYDRODYNAMISME DE LA COLONNE D'EAU

La température des eaux mesurée à différentes profondeurs a été utilisée comme traceur des échanges verticaux des masses d'eau par **Poulin (1996)** (Figure P.21, **Ogier 1999**). Ces données montrent que le lac d'Aydat est un lac *sensus stricto* dimictique, cependant comme le remarque **Philippe (1989)**, la stratification hivernale est si faible que l'on peut considérer que ce lac ne comporte qu'une période de stratification et qu'il est donc monomictique (**Ogier 1999**).

¹ Pyroxène : minéral d'une famille de silicates composant des roches magmatiques et métamorphiques

² Olivine : minéral de la famille des nésosilicates

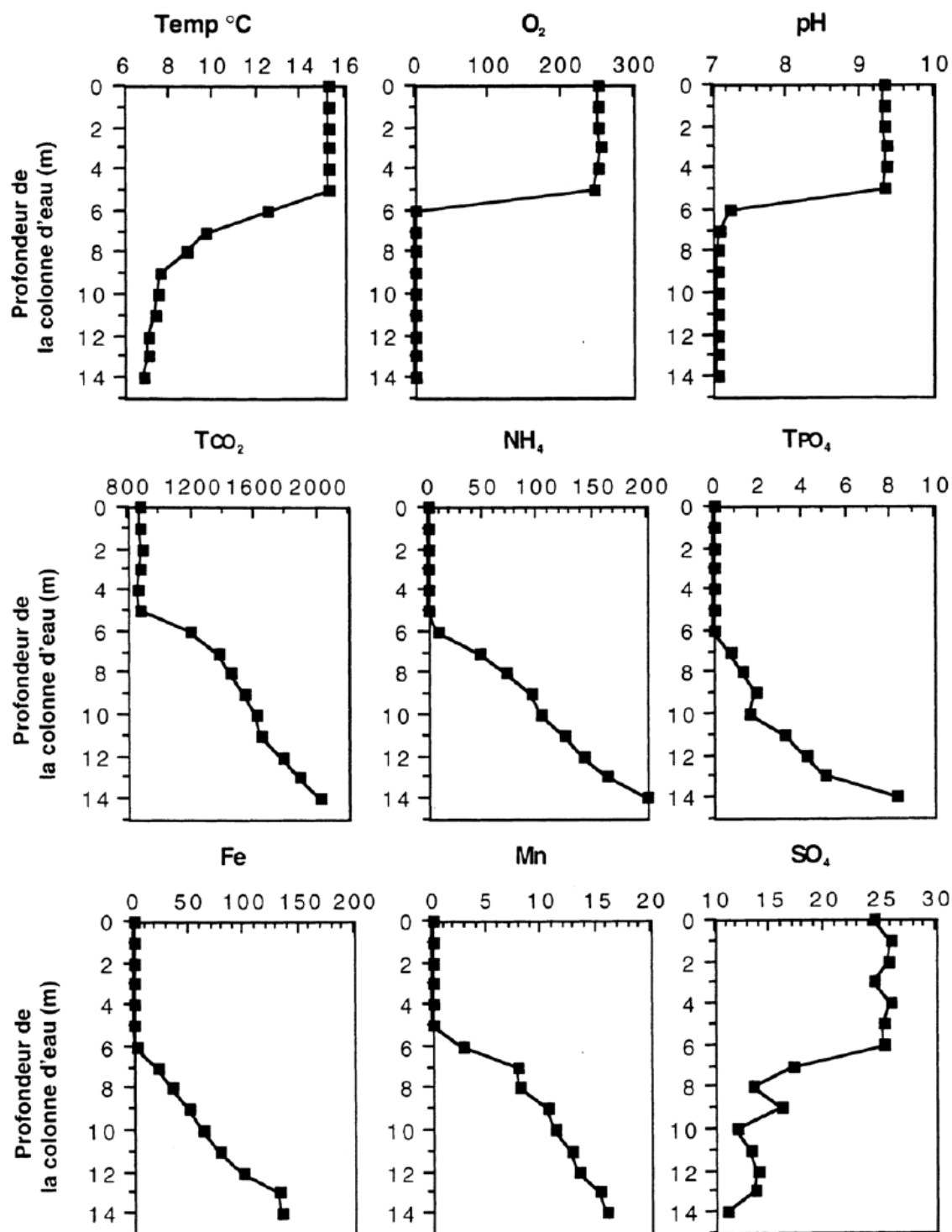


Figure P.20 : Profils de température, O₂, pH, TPO₄, Fe²⁺, Mn²⁺ et SO₄²⁻ dans les eaux du Lac d'Aydat en août 1996 lorsque la stratification thermique est bien établie. Les concentrations sont exprimées en mM et les profondeurs en m. Les données ont été acquises par le Laboratoire de Géochimie des Eaux de Paris VII et sont issues de la thèse de Ogier 1999.

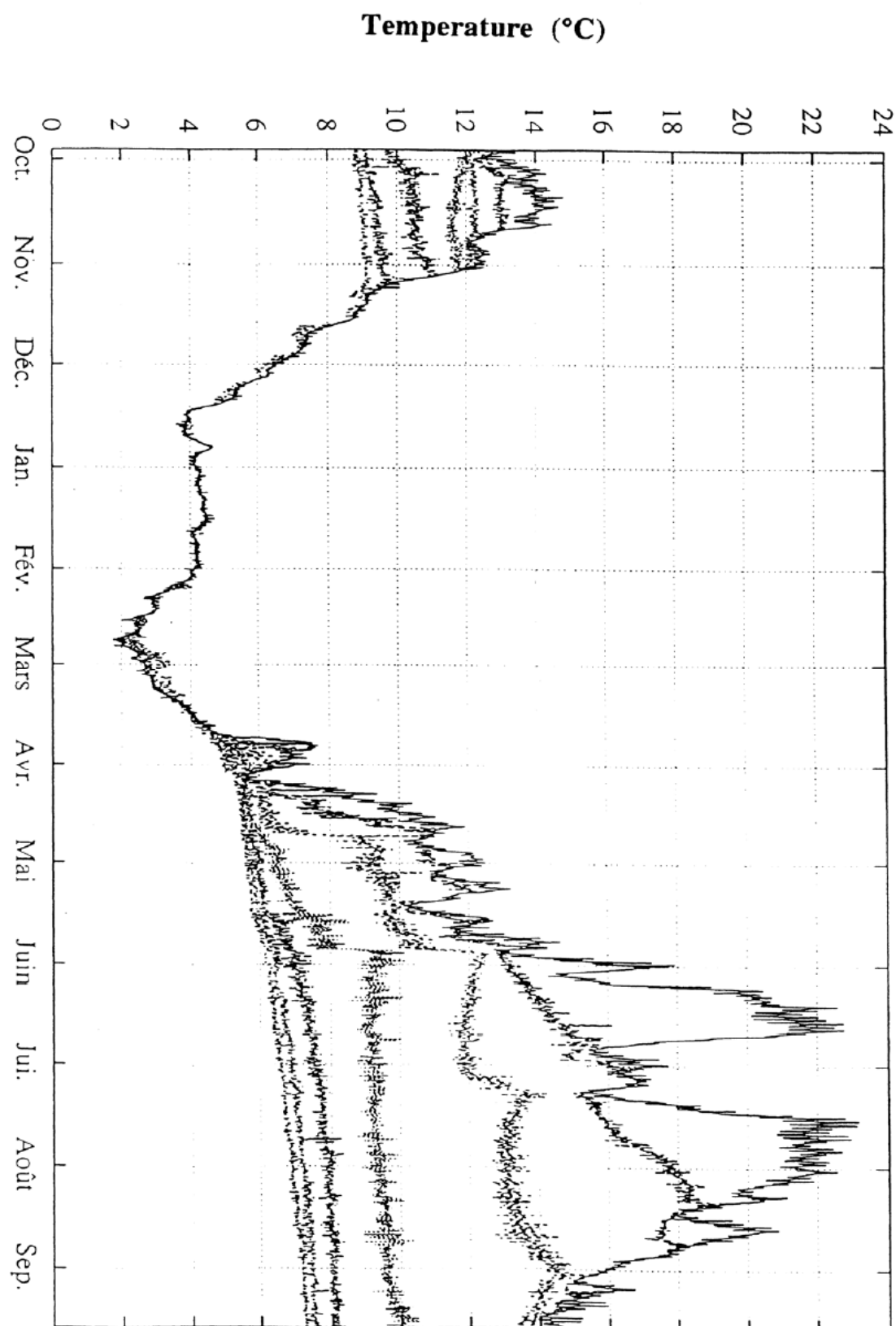


Figure P.21 :Température du lac d'Aydat, enregistrée tous les 2m, de 1,3 m à 13,3 m de profondeur, du 28 septembre 1995 au 18 septembre 1996 (Ogier 1999).

CHAPITRE I

Structure, Diversité et Successions spatio-temporelles du
bacterioplancton dans les zones anoxiques de deux écosystèmes lacustres
-Comparaison écosystémique-

CHAPITRE I: STRUCTURE, DIVERSITE ET SUCCESSIONS SPATIO-TEMPORELLES DU BACTERIOPLANKTON DE DEUX BIOTOPES ANAEROBIES

"Many (most ?) of our impressions after microbiology's first century, dominated as it is by the necessity of cultivating microorganisms, are based on what could be considered to be observations of rare species maintained in zoos." Ward (1998)

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les écologistes microbiens utilisent classiquement le terme de "boîte noire" pour qualifier les communautés microbiennes dans les environnements naturels. En regard de la complexité de ces dernières, cette image offre une vision assez réaliste de la difficulté d'appréhender cette composante. Ainsi, **Thomas Brock (1987)** a qualifié l'étude de la diversité microbienne de "*Mumbo-Jumbo*" et **Wilson (1994)** a renforcé cette idée en soulignant que la biodiversité microbienne était inaccessible par des méthodes pratiques de calcul. Collectivement ces deux assertions posent la question de l'utilité et du réalisme d'étudier la biodiversité microbienne (heureusement non partagé par de nombreux écologues !), mais soulèvent néanmoins deux questions primordiales : "*Qu'est ce que signifie la diversité microbienne et comment peut-on la mesurer ?*" Ces interrogations nous ramènent à la définition de l'espèce que nous avons abordé dans la revue bibliographique, et si ce problème majeur n'a pas encore trouvé de solution idéale, l'évolution des outils et des approches intégrées contribuera sans nul doute à définir pour cette notion un cadre réaliste et universel. La réponse suivante pourrait néanmoins être fournie aux "sceptiques": le monde microbien est immense, plus de 10^{30} individus (**Whitman et al. 1998**) (il y a 10^9 fois plus de bactéries sur terre que d'étoiles dans l'univers...), et constitue une frontière immense et inexplorée de la science ; une frontière avec des dimensions astronomiques et incroyablement complexe. Les procaryotes comprennent deux des trois domaines de la vie, dominant les processus biogéochimiques de la terre et constituent un énorme réservoir de potentialités biotechnologiques. Considérant cette perspective, nous devons connaître la diversité microbienne "*simplement parce qu'elle est là*" (Fameuse réponse de l'alpiniste Mallory quand il fut interrogé sur les motivations qui le conduisaient à escalader l'Everest). Dans un cadre moins anthropocentrique, comprendre comment les différentes populations procaryotiques s'insèrent dans les systèmes, quelles interactions elles établissent avec le biotope ou les autres communautés nécessite d'analyser leur dynamique spatio-temporelle, leur structure et leur diversité et donc de les considérer selon une perspective écologique, au même titre que les communautés de macro organismes.

Dans les écosystèmes aquatiques continentaux, les études sur la composante procaryotique, ont été plus particulièrement focalisées sur les microorganismes des zones oxydées (**Lindström 1998**,

Pernthaler *et al.* 1998, Zwisler *et al.* 2003), et si la connaissance des facteurs écologiques régissant ces communautés procaryotiques reste encore un vaste champ d'investigation, les données sur les communautés anaérobies des écosystèmes lacustres sont elles quasi inexistantes. Les microorganismes anaérobies peuvent être rencontrés au niveau sédimentaire mais également dans les colonnes d'eau anoxiques des écosystèmes lacustres. Au sein de ces écosystèmes, les zones pélagiques anoxiques peuvent être permanentes (lac méromictique) ou temporaires (hypolimnion des lacs eutrophes des régions tempérées). Ces dynamiques divergentes peuvent conduire à s'interroger sur la structure et la diversité des communautés procaryotiques dans ces deux types de biotopes (stable et évolutif). Afin d'aborder cette problématique, nous avons à "notre disposition" deux modèles lacustres, le Lac Pavin qui en raison de son caractère méromictique présente une zone anoxique stable, et le Lac d'Aydat qui en période de stratification thermique exhibe un hypolimnion anoxique temporaire déstructuré à l'automne en raison du brassage saisonnier.

La structure et la diversité des communautés procaryotiques ont été analysées dans ces deux écosystèmes, et, notre stratégie s'est orientée vers une approche descriptive *in situ* à l'aide d'outils moléculaires. Bien que la description de ces méthodes soit réalisée dans la littérature et dans les deux articles présentés dans ce chapitre (Articles 1 et 2), nous rappellerons dans la partie Matériel et Méthodes suivante, les protocoles détaillés, les performances, les avantages et les inconvénients des outils appliqués aux études que nous avons conduites. La discussion présentée dans le paragraphe IV proposera une comparaison écosystémique intégrant les résultats acquis sur les communautés anaérobies des Lac Pavin et Aydat.

II. MATERIEL ET METHODES

II.A. Prélèvement des échantillons.

Les méthodes d'écologie moléculaire étant destructives, les échantillons d'eau anoxiques sont prélevés sans contraintes liées au maintien de l'anoxie par bouteille Van Dorn horizontale (8 litres) à la verticale des isobathes 92 m pour le Lac Pavin et 15 m pour le Lac d'Aydat. A chaque date de prélèvement ont été établis des profils verticaux de température ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) et d'oxygène dissous ($\pm 0,03\text{mg/l}$, $\pm 0,2\%$), mesurés à l'aide d'une sonde multi-paramètres (oxymètre profiline oxy 197 WTW® avec sonde cellox 327).

II. B. Dénombrement de la flore microbienne

II.B.1. Dénombrement de la flore microbienne totale (coloration au DAPI)

Les échantillons, prélevés dans des flacons stériles, fixés avec du formaldéhyde 4% (concentration finale) sont conservés à 4°C jusqu'à coloration au 4'-diamidino-2-phényllidone (DAPI). 2 ml d'eau sont filtrés sous vide ($p = 100$ mbar) sur membranes noires en polycarbonate, de porosité $0.2 \mu\text{m}$ (type GTBP, 25 mm de diamètre, Millipore). Les filtres sont incubés 20 minutes dans du DAPI ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) à l'obscurité, puis rincés avec 30 ml d'eau distillée stérile. Les filtres sont séchés à l'obscurité sur papier Whatman, puis placés entre lames et lamelles dans de l'huile à immersion Olympus ($nd = 1,516$; 23°C , sans fluorescence). Les dénombrements sont réalisés en microscopie à épifluorescence ($\times 1000$) sous filtres UV (modèle DMIRB, Leica).

II.B.2. Dénombrement de groupes microbiens ciblés (Méthode FISH : Fluorescent *in situ* Hybridization)

La méthode FISH combine la précision de la biologie moléculaire avec l'information visuelle fournie par la microscopie afin de permettre la visualisation et l'identification de cellules microbiennes dans leurs habitats naturels. Si la technique d'hybridation *in situ* par des sondes ADN ou ARN radioactives a été développée indépendamment par deux équipes à la fin des années 1960 sur des préparations cytologiques d'oocytes de *Xenopus* (**Pardue et Gall 1969, John et al. 1969**), la première application microbiologique de cette méthode ne remonte qu'à une vingtaine d'années (**Giovannoni et al. 1988**). Le développement des marqueurs fluorescents (**Pinkel et al. 1988**), offrant une plus grande sécurité d'utilisation, une meilleure résolution, et moins d'étapes de détection que la micro autoradiographie, a permis une extension de la méthode FISH aux études d'écologie microbienne (**Amann et al. 1990**).

A- ASPECTS TECHNIQUES.

La méthode FISH permet la détection de séquences d'acides nucléiques par des sondes marquées par un fluorochrome (Fluorescein-isothiocyanate (FITC), Texas red, Cyanine, *etc.*) hybridant spécifiquement la séquence cible complémentaire à l'intérieur de la cellule intacte. La procédure inclue les étapes suivantes (i) fixation des cellules, (ii) préparation de l'échantillon, (iii) hybridation avec les sondes spécifiques de la séquence cible, (iv) étapes de lavage pour éliminer la sonde en excès, (v) montage, visualisation et exploitation des résultats. La molécule cible de référence pour l'application de la méthode FISH en bactériologie est l'ARNr16S en raison de sa

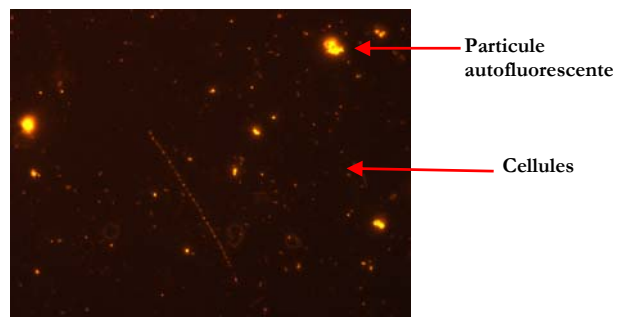
stabilité génétique, de la structure de ses domaines présentant des régions conservées et des régions variables, et de son nombre élevé de copies (Woese 1987). Les sondes oligonucléotidiques pour chaque niveau taxonomique, depuis les domaines *Eubacteria* et *Archaea* jusqu'au niveau du genre ou de l'espèce peuvent être dessinées (Amann *et al.* 1995, Moter et Gobel 2000). Le choix du site ciblé et le dessin des sondes sont réalisés en utilisant des logiciels spécifiques comme le programme ARB développé au département de Microbiologie de l'université de Munich (Allemagne) (<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>). Les sondes FISH doivent ainsi être spécifiques, sensibles et pénétrer facilement dans la cellule. Une sonde oligonucléotidique typique contient entre 15 et 30 paires de bases.

B- PROBLEMES ET LIMITES DE LA METHODE FISH :

(1) Résultats faussement positifs

■ Autofluorescence: Certaines bactéries des genres *Pseudomonas* (Brown et Lowbury 1996), *Legionella* (Wilkinson *et al.* 1990), les cyanobactéries (Schönhuber *et al.* 1999), certaines *Archaea* méthanogènes (Sorensen *et al.* 1997) et le matériel particulaire (débris biologiques ou inorganiques, (Vesey *et al.* 1997), Figure C.3) présent dans l'environnement de la bactérie peuvent produire une fluorescence naturelle.

Figure C.3: Exemple d'image obtenues en microscopie à épifluorescence après hybridation avec la sonde Arch915 ciblant les *Archaea*.

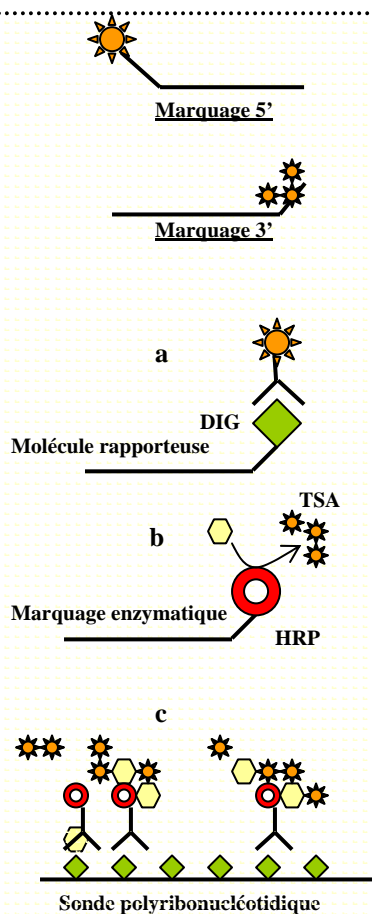


■ Faible spécificité: La précision et la fiabilité de la méthode sont fortement dépendantes de la spécificité des sondes oligonucléotidiques. Si le dessin et l'évaluation critique de nouvelles sondes sont des étapes cruciales, des contrôles positifs (souches cultivées) et des contrôles négatifs (souches affiliées présentant peu de mésappariements) devraient être systématiquement inclus. L'imprécision de certaines séquences et la rapide expansion des banques de données (Bathia *et al.* 1997) nécessitent un contrôle régulier des séquences des sondes sur les dernières versions des logiciels appropriés. L'utilisation de compétiteurs peut également permettre d'accroître la fiabilité des résultats (Manz *et al.* 1992).

(2) Résultats faussement négatifs

■ Pénétration insuffisante de la sonde : La structure de la paroi cellulaire peut conduire à une pénétration insuffisante de la sonde et donc à de faibles intensités de signal. Les bactéries Gram-négatives sont, en général, relativement perméables aux sondes oligo- ou polyribonucléotidiques. L'hybridation de cellules Gram-positives, particulièrement celles exhibant de longues chaînes d'acides mycoliques, peut nécessiter des procédures de fixation et de prétraitements spéciaux.

■ Faible contenu en ARNr : Le contenu cellulaire en ARNr peut considérablement varier, non seulement entre les espèces, mais également en fonction de l'état physiologique de la cellule (Wallner *et al.* 1993). Une faible activité physiologique peut conduire à une faible intensité de signal et donc à un résultat faussement négatif. Pour la détection d'espèces présentant de faibles croissances, le marquage par le fluorochrome Cy3 est recommandé (Moter et Göbel 2000). La sensibilité peut également être accrue par l'utilisation de systèmes d'amplification de signal (molécule rapporteur, amplification par marquage enzymatique) ou de sondes polyribonucléotidiques (Figure C.4).



(1) : marquage direct: le moins coûteux, le plus utilisé, et le plus rapide car ne nécessite pas d'étapes de détection supplémentaire après l'hybridation. Marquage durant la synthèse de la sonde en 5' (par aminolinker) ou en 3' (par terminal transférase) par un ou plusieurs fluorochromes. Le signal peut être accru en marquant la sonde aux deux extrémités (1 molécule fluorescente en 3',4 à l'extrémité 5' et un espaceur pour prévenir l'extinction (« quenching ») de fluorescence (Spear *et al.* 1999)).

(2) : marquage indirect :

(a) liaison de la sonde à une molécule rapporteuse comme la digoxigénine (DIG) détectée par un anticorps fluorescent (Zarda *et al.* 1991).

(b) amplification par marquage enzymatique : système de « Tyramide signal amplification » (TSA), également connue sous le terme de CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition). Les oligonucléotides sont marqués avec la horseradish peroxidase (HRP) utilisant la tyramide-fluorescéine comme substrat (Schönhuber *et al.* 1997). Le système TSA permet une amplification 10 à 20 fois de l'intensité du signal (mais réduction du nombre de cellules positives car pénétration insuffisante de la molécule de part son haut poids moléculaire).

(c) Sondes polyribonucléotidiques marquées par la digoxigénine couplée à la TSA: probablement l'approche la plus sensible (DeLong *et al.* 1999).

Figure C.4: Marquage direct (1) et indirect (2) des sondes marquées utilisant la digoxigénine (DIG), la horseradish peroxidase (HRP) ou le système d'amplification du signal tyramide (TSA). D'après Moter et Göbel 2000.

■ **"Photobleaching"**: La majorité des fluorochromes utilisés pour le marquage des sondes sont rapidement altérés par les longueurs d'ondes d'excitation (phénomène de "Fading"), conduisant à leur destruction irréversible (de quelques secondes à quelques minutes). Pour limiter ce problème, l'utilisation de fluorochromes Cyanine photostables et d'"antifading" dans le milieu de montage pour l'observation sont recommandés (**Moter et Göbel 2000**).

C- PROTOCOLE UTILISE DANS CETTE ETUDE

Les échantillons, prélevés dans des flacons stériles, fixés avec du formaldéhyde 4% (concentration finale) sont incubés 5 heures à 4°C avant l'étape de filtration. 2 ml d'échantillon sont filtrés sous vide (100 mbar) sur membrane en polycarbonate de porosité 0,2 µm (type GTTP, 25 mm de diamètre, Millipore). Les filtres sont rincés avec 30 ml de tampon Phosphate Buffer Saline (PBS, NaCl (40mM)- Na₂HPO₄ (0,6 mM)- NaH₂PO₄ (0,6 mM) ; pH 7,2) et déshydratés avec un gradient d'éthanol 50-80-96% (3ml, 3 minutes à chaque étape). Ces solutions sont successivement évacuées en appliquant un vide de 100 mbar. Les filtres sont séchés sur papier Whatman et conservés à -18°C. Le protocole d'hybridation utilisé est celui décrit par **Glockner *et al.* (1996)**. Les sondes oligonucléotidiques (Tableau C.2), synthétisées par la société MWG Biotech, sont marquées avec le fluorochrome Indocarbocyanine (CY3, $\lambda_{\text{excitation}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 570 \text{ nm}$), et conservées à -20°C. Avant de procéder à l'hybridation, les filtres sont découpés en quart en conditions stériles. Chaque section est placée sur une lame de verre et recouverte avec 20 µl de tampon d'hybridation contenant 2µl (10 ng.ml⁻¹) de sonde. L'hybridation est réalisée dans une boîte noire à des températures variables, en fonction de la sonde utilisée (Tableau C.2), pendant 90 minutes.

Probe	Sequence (5'→ 3')	Position ^a	Target	% F ^b	NaCl ^c	T _a ^d	Reference
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	Eubacteria	35	80	46	Amann <i>et al.</i> 1990
ARCH915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	915-935	Archaeae	20	200	46	Stahl et Amann. 1991
SRB 385R	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	385-402	SRB (<i>δ-proteobacteria</i>)	35	88	46	Ramsing <i>et al.</i> 1996
660R	GAATTCACATTCCCCCTCTG	660-679	<i>Desulfobulbus</i>	60	15	46	Devereux <i>et al.</i> 1992
129F	CAGGCTTGAAGGCAGATT	129-146	<i>Desulfobacter</i>	20	15	46	Devereux <i>et al.</i> 1992
687R	TACGGATTTCACCTCCT	687-702	<i>Desulfotribrio</i>	10	15	46	Devereux <i>et al.</i> 1992
MB1174	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	1174-1195	<i>Méthanobacteriaceae</i>	40	-	62	Raskin <i>et al.</i> 1994
MSMX860	GGCTCGCTCACGGCTTCCCT	860-880	<i>Méthanosarcinaea</i>	40	-	60	Raskin <i>et al.</i> 1994
MG1200	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	1200-1220	<i>Méthanomicrobiaceae</i>	40	-	53	Raskin <i>et al.</i> 1994

Tableau C.2: Sondes oligonucléotidiques utilisées pour l'hybridation in situ ^aPosition sur l'ARNr 16S, ^b Concentrations en formamide dans le tampon d'hybridation, ^c Concentration en NaCl dans le tampon de lavage (mM), ^d Température d'hybridation (°C).

Du papier absorbant est placé dans les boîtes, humidifié avec 2 ml de tampon d'hybridation (dépourvu de sonde) dans le but de prévenir la déshydratation des sections de filtre durant le processus d'hybridation. Les tampons d'hybridation contiennent 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), et une concentration variable en Formamide (Tableau C.2). A l'issue de l'étape d'hybridation, les filtres sont incubés 20 minutes dans 20 ml de tampon de lavage à 48°C, puis séchés sur du papier Whatman à l'obscurité. La solution de lavage contient 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM de Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.01% SDS et une concentration variable en NaCl (Tableau C.2). Un double marquage DAPI est réalisé afin de s'assurer que la fluorescence observée provient des organismes cibles et non de particules autofluorescentes. Les filtres sont placés entre lame et lamelle dans un milieu glycérolé (huile Citifluor, Canterbury, Angleterre). Les bactéries sont dénombrées (x1000) en microscopie à épifluorescence (modèle DMIRB, Leica) sous filtre vert ($\lambda=512\text{nm}$) avec une longueur d'onde d'émission de 615 nm.

II.C. Etude de la diversité des communautés microbiennes par les méthodes de "Fingerprint".

Les études environnementales des assemblages microbiens complexes (diversité, structure, activités, écologie, évolution, *etc.*) ont nécessité le développement et l'utilisation de méthodes indépendantes de la culture, comme celles basées sur l'amplification PCR¹ des gènes ARNr. Si le séquençage des produits PCR clonés fournit de précieuses informations phylogénétiques sur les membres dominants des communautés microbiennes, cette méthodologie est difficilement applicable à un grand nombre d'échantillons en raison de son coût et de son caractère chronophage. Les procédures moléculaires, regroupées sous la dénomination de méthodes de "Fingerprint" (ou méthodes d'empreintes), sont essentielles pour l'analyse de multiples échantillons. Ces techniques fournissent un profil de la diversité d'une communauté sur la base d'une séparation physique de séquences d'acides nucléiques. Ces méthodes permettent d'obtenir une image globale des communautés microbiennes complexes sans identification préalable de leurs séquences. Des méthodologies comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, **Muyzer et al. 1993**), la TTGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, **Felske et al. 1998**, **Heuer et al. 1997**), la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis, **Lee et al. 1996**, **Schweiger et Tebbe 1998**), et la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, **Liu et al. 1997**, **Osborn et al. 2000**) sont particulièrement pertinentes pour caractériser l'évolution spatiale et/ou temporelle de la structure

¹ PCR : Polymerase Chain Reaction

des communautés microbiennes en relation avec des modifications des conditions physico-chimiques et/ou biologiques.

A- LIMITES COMMUNES AUX METHODES DE FINGERPRINT

« *Each physical, chemical and biological step involved in the molecular analysis of an environment is a source of biais which will lead to a distorted view of the real word* » (Wintzerode et al. 1997)

■ Extraction des acides nucléiques : Plusieurs protocoles d'extraction d'acides nucléiques existent (Bruce *et al.* 1992, Furhman *et al.* 1988, Holben 1988), mais peu d'études ont testé leur efficacité respective. Le rendement d'extraction est également une donnée difficilement quantifiable car la quantité totale d'acides nucléiques présents dans l'échantillon naturel est souvent inconnue. L'efficacité d'une même technique de lyse peut varier en fonction du type d'échantillon (eau, sédiment, sol) et de sa composition. Par exemple, les spores sont moins facilement lysables que les cellules végétatives, et les bactéries Gram-positives sont plus résistantes à la lyse cellulaire que les Gram-négatives. Certaines études ont également révélé que les cellules de petites tailles (0.3-1.2µm), fréquemment rencontrées dans les environnements naturels, sont plus résistantes à la lyse cellulaire (Head *et al.* 1998).

■ Amplification PCR :

- De faibles différences dans les séquences des régions universellement conservées de l'ARNr, peuvent conduire à une amplification sélective de certaines séquences (Head *et al.* 1998).
- Le nombre de copies du gène ARNr16S sur le génome des microorganismes peut varier de 1 à 14 (Cole et Giron 1994, Young et Cole 1993). Ainsi, un mélange contenant un nombre égal de cellules de *Bacillus subtilis* (10 opérons ARNr 16S) et de *Thermus thermophilus* (2 opérons ARNr 16S) conduira à un ratio 5 :1 dans le produit PCR final.
- Variabilité intra-opérons² : les séquences des différentes copies du gène ADNr16S chez un même individu peuvent différer de plus de 5% (Clayton *et al.* 1995) et l'amplification de ces séquences hétérologues peut conduire à une surestimation de la diversité.
- Formation de molécules chimères³ : elles peuvent représenter jusqu'à 30% des produits PCR durant une co-amplification de séquences proches (comme les séquences ADNr 16S hétérologues d'une même bactérie, Wang et Wang 1996).
- Formation d'hétéroduplexes⁴ au cours de la phase de plateau de l'amplification PCR (Thompson *et al.* 2002) conduisant à une surestimation du nombre de variants de

² Opéron : groupe de gènes comprenant un opérateur (accepteur de l'ARN polymérase), un promoteur et un ou plusieurs gènes structuraux contrôlés.

³ Chimères : résultent de la fusion de deux séquences durant l'amplification (un amplicon incomplètement élongé joue le rôle d'une amorce sur une séquence hétérologue)

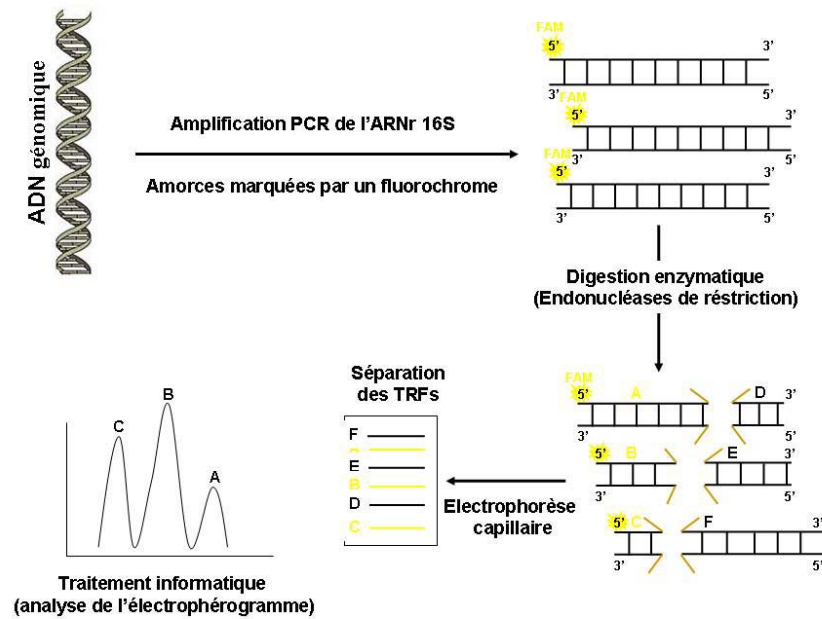


Figure C.5: Schéma des principales étapes de l'analyse TRFLP

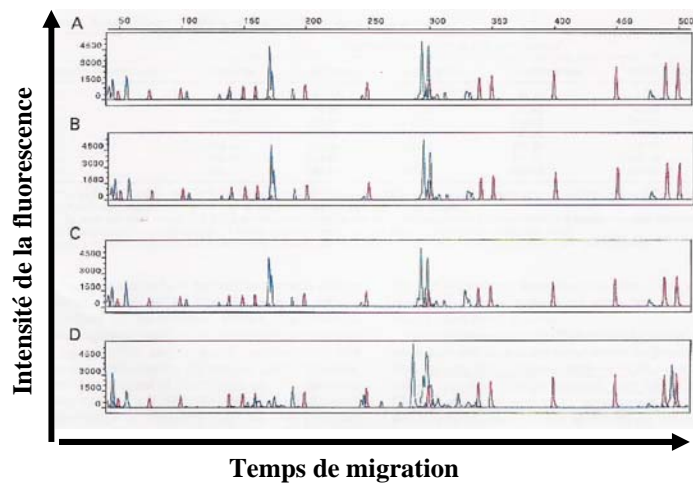


Figure C.6: Profils TRFLP de produits PCR amplifiés à partir d'ADN extrait d'échantillons de sols pollués (A, B et C) et non pollué (D). La taille du fragment (en paire de bases) est présentée au sommet de l'électrophérogramme, l'abondance relative de chaque fragment correspond à l'intégration de la paire des pics (nombre d'unité de fluorescence détectée). Les pics rouges correspondent au standard ADN, les pics bleus et verts représentent respectivement les fragments de restriction obtenus aux extrémités 5' et 3'. (D'après Osborn *et al.* 2000).

Fluorochrome/ N° TRF ^a	Minutes ^b	Taille ^c	Hauteur du pic ^d	Aire du pic ^e	Référence ^f
B, 5	75.43	138.86	833	6810	1460
B, 6	83.55	159.88	357	2752	1617
B, 7	87.21	168.62	110	880	1688
B, 8	88.19	170.96	4833	39009	1707
B, 9	89.07	173.05	2633	22453	1724
B, 10	119.97	245.93	408	4124	2322

Tableau C.3 : Exemple de données numériques obtenues. (a) B indique pic bleu (dans l'exemple de la figure 1, correspond aux pics obtenus à l'extrémité 5'), (b) Temps de migration du fragment en minutes durant l'électrophorèse avant qu'il atteigne le détecteur, (c) taille du fragment en paire de bases, (d) hauteur du pic en unité de fluorescence, (e) aire relative du pic en fonction de sa hauteur rapportée à l'aire totale des pics, (f) chaque pic est assigné à un point référence.

⁴ Hétéroduplexes : séquences hétérologues réalisant une hybridation croisée

séquences (les hétéroduplexes peuvent être séparés des homoduplexes au cours de la migration électrophorétique (différences conformationnelles)).

- Certains auteurs ont également postulé que les séquences à fort G+C % sont discriminées durant la PCR en raison d'une plus faible efficacité de séparation des doubles brins durant l'étape de dénaturation (**Reysenbach *et al.* 1992**).

- La fidélité des amplifications peut varier en fonction de la polymérase ADN thermostable (Taq) utilisée (les fournisseurs ont défini des taux d'incorporations erronées compris entre 0.000002% et 1.3% en fonction de la Taq, **Head *et al.* 1998**).

B- ASPECTS TECHNIQUES.

Dans le cadre de ce travail, deux méthodes de "*fingerprint*" ont été utilisées : la TRFLP et la TTGE, aussi seuls les principes de ces deux méthodes seront détaillés.

(1) DESCRIPTION DE LA TRFLP (Figure C. 5)

Développée à l'origine pour l'identification de *Mycobacteria* par **Avaniss-Aghajani *et al.* (1996)**, le potentiel de la TRFLP pour analyser le polymorphisme des gènes ARNr16S de différentes bactéries et pour obtenir des informations sur la structure des communautés a été révélé par **Liu *et al.* (1997)** et **Clement *et al.* (1998)**. L'analyse par TRFLP est basée sur la digestion par des endonucléases de restriction de produits PCR marqués à l'extrémité 5' et/ou 3' par un fluorochrome. Un standard de taille ADN également marqué par un fluorochrome est ajouté aux produits de digestion, et les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel ou par électrophorèse capillaire. La détection et l'analyse des fragments terminaux de restriction (TRFs) sont réalisées par un système laser et un analyseur automatisé. L'électrophorégramme présentant le profil de la communauté microbienne (sous forme d'une série de pics de différentes couleurs et de différentes tailles) fournit deux types d'informations (Figure C. 6, Tableau C.3) :

- Qualitative : variation de la taille (en paire de base, calculée en référence au standard interne) et du nombre de TRFs différents présents dans le profil (exemple : les profils obtenus pour les sols pollués sont clairement différents du profil du sol non pollué, Figure C.6).

- Semi quantitative : Variations de la hauteur de chaque pic (calculée par rapport à la quantité de fluorescence détectée) et donc de l'abondance relative de chaque fragment de restriction (intégration de l'aire du pic).

♥ATOUTS SUPPLEMENTAIRES DE LA TRFLP.

Marsh et ses collaborateurs (2000), ont développé le site web T-RFLP analysis program (TAP) (<http://www.cme.msu.edu/RDP/trflp/#program>) permettant à l'expérimentateur de répondre aux questions suivantes : (i) Quelle(s) enzyme(s) de restriction permettent la meilleure discrimination pour estimer la diversité d'une communauté? (ii) Quelle(s) enzyme(s) de restriction présentent la meilleure résolution pour un groupe phylogénétique d'intérêt? (iii) Quelle combinaison amorce-enzyme permet d'optimiser l'étude d'une communauté? Le logiciel TAP permet également, à partir de séquences ARNr16S, de simuler la procédure T-RFLP (digestion *in silico*). D'autre part, si les amplicons sont digérés indépendamment par plusieurs enzymes de restriction (au moins 3) une identification présomptive des organismes (en utilisant la base de données RDP comme substitut de communauté) est en théorie possible. Cette dernière application est cependant peu applicable aux profils complexes.

♣LIMITES SPECIFIQUES DE LA TRFLP.

La TRFLP est une méthode robuste fournissant une information de grande qualité (précision de la taille des TRFs), reproductible **Osborn et al. (2000)**, permettant d'étudier une communauté microbienne en terme de composition qualitative et semi-quantitative. Un certain nombre de facteurs limitants sont néanmoins à prendre en considération. L'intégration de l'aire de chaque pic fournit une mesure de la proportion relative de chaque composante de la communauté étudiée, cependant en raison de l'amplification préférentielle de certaines séquences (**Suzuki et Giovannoni 1996**), la valeur absolue de l'abondance relative doit être interprétée avec précaution. Il est également possible que certains microorganismes présentent le même emplacement du site de restriction sur l'ARNr16S. Ceci conduit d'une part à une sous-estimation de la diversité mais également à une aire relative de ces pics plus importante sur le profil. Si les systèmes automatisés d'électrophorèse capillaire permettent d'accroître la résolution de la méthode, un certain nombre de problèmes sont posés par les fragments inférieurs à 50 pb⁵ et supérieurs à 500 pb. Les fragments de petites tailles (<50 pb) sont facilement séparables par électrophorèse ce qui permet de déterminer précisément leurs tailles. Cependant, le mouvement Brownien, l'existence d'artefacts PCR (ex : dimère d'amorces), et la perte d'une fraction de ces petits fragments au cours des différentes étapes de purification des échantillons posent un certain nombre de problèmes pour l'inclusion de ces derniers dans l'analyse T-RFLP. La distance de migration entre les fragments décroît avec l'augmentation de leur taille, il existe ainsi une taille maximale (en paire

⁵ pb : paire de bases

de bases) au delà de laquelle la résolution n'est plus acceptable pour l'analyse. En conséquence, certains auteurs (**Engebreston et Moyer 2003**) recommandent d'exclure des analyses les longs fragments (>500 pb). D'autre part, si le type et le nombre d'enzymes de restriction utilisées sont des paramètres importants pour obtenir une représentation pertinente d'une communauté microbienne ; cette détermination ne peut être qu'empirique (**Engebreston et Moyer 2003**). Ainsi, chaque enzyme est définie par une fidélité⁶ spécifique ne permettant pas d'établir une normalisation de la méthode et rendant complexe les comparaisons écosystémiques.

(2) DESCRIPTION DE LA TTGE⁷ (Figure C.7)

L'introduction de la méthode de Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), par **Muyzer *et al.* (1993)** a très rapidement attiré l'attention des microbiologistes environnementaux. La DGGE et sa méthode relative, la TTGE, sont désormais utilisées en routine dans de nombreux laboratoires pour répondre à différentes problématiques environnementales (suivis spatiaux/temporels de communautés microbiennes, études de la complexité des communautés naturelles...). La TTGE permet la séparation de fragments de même taille mais présentant des séquences différentes (**Rosenbaum et Reisner 1987, Reisner *et al.* 1991, Muyzer 1997**). Cette séparation est basée sur la mobilité électrophorétique de molécules d'ADN doubles brins partiellement fusionnés, sur des gels de polyacrylamide, en fonction d'un gradient linéaire de température (pour la DGGE : gradient de dénaturants (urée et formamide)). Lorsque le domaine de la molécule d'ADN présentant le plus faible point de fusion a atteint sa température de fusion (T_m), la migration de la molécule sur le gel est stoppée. Ainsi, des variations de séquences à l'intérieur de ces domaines (fonction du pourcentage G+C) conduisent à des variations de la T_m . Les molécules présentant différentes séquences stopperont ainsi leurs migrations à différentes positions sur le gel. **Myers et ses collaborateurs (1985)** estiment que 50% des variants de séquences peuvent être détectés par TTGE. Ce pourcentage peut être augmenté en ajoutant une séquence riche en GC ("GC-clamp") à l'extrémité 5' du fragment d'ADN (**Myers *et al.* 1985, Sheffield *et al.* 1989**). Cette séquence de guanines (G) et de cytosines (C) est ajoutée à l'extrémité 5' d'une des amorces utilisées pour l'amplification PCR, cette séquence est co-amplifiée et introduite dans l'amplicon (**Sheffield *et al.* 1992**). La séquence riche en GC (30 à 50 nucléotides) joue le rôle d'un domaine hautement fusionné évitant une dissociation complète des doubles brins d'ADN en simples brins lors de la migration.

⁶ Fidélité d'une enzyme de restriction : capacité d'une endonucléase de restriction à identifier le nombre réel de variants ARNr16S dans l'échantillon

⁷ TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

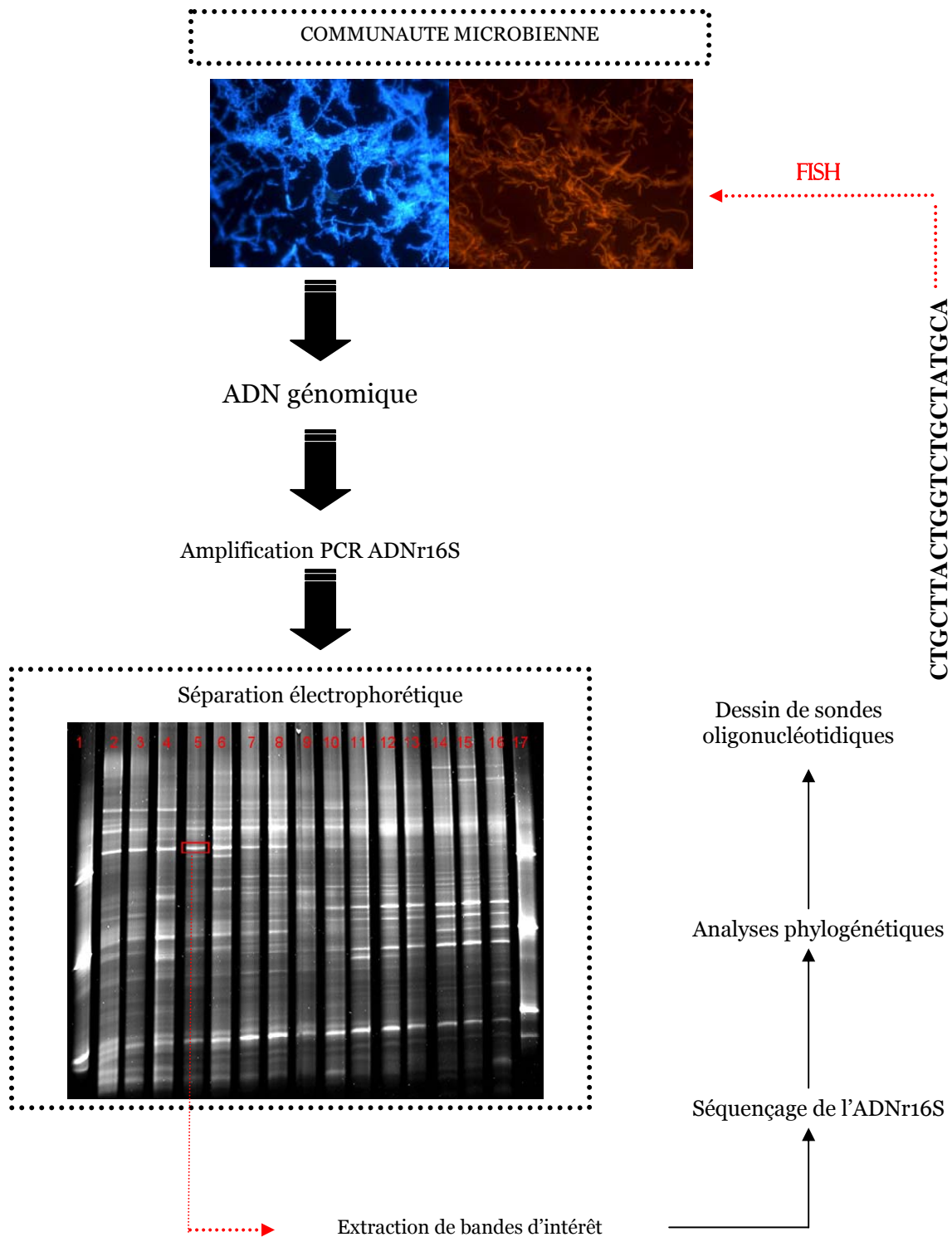


Figure C.7 : Schéma présentant les différentes étapes de l'analyse d'une communauté microbienne par TTGE. L'ADN extrait d'échantillons environnementaux est amplifié par PCR (ARN_r16S). Les produits PCR sont séparés par une électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (TTGE). L'affiliation phylogénétique des membres prédominants de la communauté peut être établie après excision et réamplification des bandes d'intérêt. D'autre part la séquence obtenue peut être utilisée pour dessiner des sondes oligonucléotidiques pour la détection de populations bactériennes spécifiques dans l'échantillon environnemental (FISH).

♥ ATOUTS SUPPLEMENTAIRES DE LA TTGE.

La TTGE offre la possibilité d'identifier des membres de la communauté par séquençage des bandes d'intérêt excisées du gel (Figure C.7). Cette étape pouvant permettre le dessin de sondes spécifiques (Figure C.7) utilisées secondairement pour cibler les populations d'intérêt dans leur environnement naturel par hybridation *in situ* (**Nielsen *et al.* 1999**). Ces applications ne sont pas réalisables avec d'autres méthodes de "fingerprint" comme la TRFLP (**Liu *et al.* 1997**). Une direction également intéressante dans le cadre de cette méthodologie est l'utilisation de gènes fonctionnels comme marqueurs moléculaires pour analyser des évolutions dans l'activité métabolique de communautés microbiennes (**Jeffrey *et al.* 1996, Paul 1996**). Ainsi, par exemple, la DGGE a été utilisée par **Wawer et ses collaborateurs (1997)** pour étudier l'expression différentielle du gène de la [NiFe] hydrogénase de différentes populations de *Desulfovibrio*.

♠ LIMITES SPECIFIQUES DE LA TTGE (et de la DGGE)

La TTGE et la DGGE sont reconnues comme des approches moléculaires pertinentes, reproductibles, rapides, et peu expansives en microbiologie environnementale, permettant l'étude de la complexité et de la dynamique de communautés microbiennes (**Muyzer 1999**). Cependant, ces méthodologies ne permettent la séparation que de fragments relativement courts (environ 500 pb) limitant l'information pour l'analyse phylogénétique et le dessin de sondes spécifiques (**Muyzer et Smalla 1998**). D'autre part, les fragments d'ADN présentant de faibles variations de séquences sont souvent difficilement séparables les uns des autres (**Vallaey *et al.* 1997**). En conséquence, une bande identifiée sur le gel peut en réalité correspondre à deux espèces ADN_r16S ou plus. Cette co-migration pose également des problèmes pour l'isolement des séquences à partir de l'extraction de bandes. La résolution et la sensibilité de ces méthodes électrophorétiques ne permettent en général d'accéder qu'à un profil des espèces prédominantes dans la communauté. Différentes études ont révélé que seules les populations bactériennes représentant plus de 1% de l'abondance de la communauté totale peuvent être détectée par DGGE (**Muyzer *et al.* 1993, Murray *et al.* 1996**). Enfin, certains auteurs ont noté que le GC-clamp favorise la formation d'hétéroduplexes (**Thompson *et al.* 2002**)

C- PROTOCOLES UTILISÉS DANS CETTE ETUDE

(1) Etapes communes aux deux méthodes

■ Préparation des échantillons : 400 ml d'eau sont filtrés sur membrane en polycarbonate de porosité 0.2µm (Type GTTP, 47mm de diamètre, Millipore), préalablement stérilisées sous UV. Les échantillons prélevés dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat peuvent être filtrés au laboratoire. Cependant, en raison des fortes concentrations en FerII du monimolimnion du Lac Pavin, les échantillons sont filtrés sur site afin de limiter la précipitation du fer ferrique (Figure C.8). Les filtres sont stockés à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction d'ADN génomique.

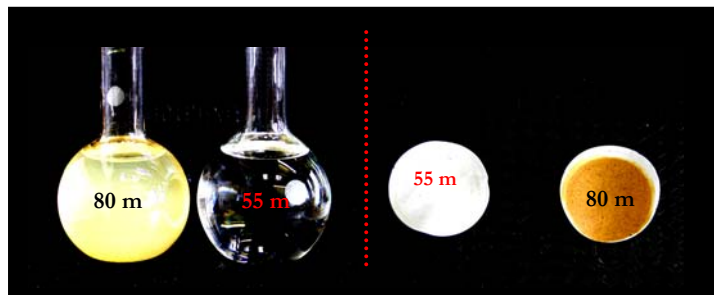


Figure C.8: Observation du précipité de fer ferrique des échantillons d'eau du monimolimnion du Lac Pavin et conséquences de la formation de ce dernier sur la filtration (en comparaison d'un échantillon du mixolimnion). Les photos ont été réalisées 3 heures après contact avec l'atmosphère.

■ Extraction d'ADN génomique (Ausubel *et al.* 1987): 560 µl de tampon Tris-EDTA (Tris-Base 10mM, EDTA 1mM, pH 8) et 7 µl de lysozyme (250 µl.ml⁻¹) sont introduits dans le tube contenant le filtre. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 30 µl de SDS 0,5% (Concentration finale) et 3 µl de protéinase K (100 µg.ml⁻¹) sont ajoutés. Le mélange est incubé 60 minutes à 37°C. 100 µl de NaCl (0,7M) et 80 µl de CTAB/NaCl (1% wt/vol) sont ajoutés et le mélange est incubé à 65°C pendant 10 minutes. 780 µl de Chloroforme/Isoamyl alcool (24 :1) est ajouté, après centrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant est récupéré et 780 µl d'un mélange phénol/chloroforme/isoamyl alcool (25 :24 :1) est ajouté. Après centrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C), l'ADN contenu dans le surnageant est précipité avec 0,6 volume d'isopropanol et incubé 12 heures à -20°C. Le mélange est centrifugé (14000 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant éliminé et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol 70% et centrifugé une seconde fois (14000 rpm, 20 min, 4°C). Les culots sont séchés sous vide, repris dans 50 µl de tampon Tris-EDTA et conservés 1 nuit à 4°C pour permettre la dissolution des acides nucléiques dans le tampon. Les ADN génomiques sont conservés à -20°C. L'ADN génomique est dosé avec le kit "DNA quantitation kit Fluorescence Assay" (Sigma).

Amorces	Séquences	Références
27f-FAM (a)	FAM 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Humayoun <i>et al.</i> 2003
27f-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGCGG CGGGGGCACGGGGGGAGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'	Weisburg <i>et al.</i> 1991
21f-FAM	FAM 5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3'	Béja <i>et al.</i> 2002
1492r	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Humayoun <i>et al.</i> 2003
958r	5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3'	Béja <i>et al.</i> 2002
907r	5'-CCG TCA ATT C(AC) TTT (AG)A GTT T-3'	Brosius <i>et al.</i> 1978
518r	5'- ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Muyzer <i>et al.</i> 1993

Tableau C.4 : Séquences des amorces utilisées dans cette étude.

Organismes cibles	<i>EUBACTERIA</i>		<i>ARCHAEA</i>
	TRFLP	TTGE	TRFLP
Tampon 10X (en µl)	5	5	5
MgCl ₂ (en µM)	2	2	2
Deoxyribonucléotide triphosphate (en µM)	200	200	200
ADN polymérase (Taq) (en unités)	1,25	1,25	1,25
Amorce forward (en pmoles)	27f-FAM (10 pmoles)	27f-GC (10 pmoles)	21f-FAM (10 pmoles)
Amorce reverse (en pmoles)	Univ-1492r ou Univ-907 r (10 pmoles)	518r (10 pmoles)	958r ou Univ-907r (10 pmoles)
ADN génomique (en ng)	10-100	10-100	10-100
Eau distillée stérile (en µl)	Qsp 50 µl	Qsp 50 µl	Qsp 50 µl

Tableau C.5 : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification PCR en fonction du domaine procaryotique ciblé (Eubactéries ou *Archaea*) et de l'approche utilisée (TTGE ou TRFLP). Les amorces forward utilisées pour la TRFLP sont marquées en 5' par le fluorochrome FAM, celles pour la TTGE présentent une le GC-clamp

Organismes cibles	<i>EUBACTERIA</i>				<i>ARCHAEA</i>	
Méthodes	T-RFLP		TTGE		T-RFLP	
	(couple 27f-FAM/1492r)		(couple 27f-GC/518r)		(Couple 21f-FAM/958r)	
	Température	Temps	Température	Temps	Température	Temps
1- Dénaturation initiale	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min
2- Dénaturation	95°C	1 min	94°C	30 s	95°C	1 min
3- Hybridation	55°C	1 min	55°C	30 s	55°C	1 min
4- Elongation	72°C	1 min	72°C	30 s	72°C	1 min 30
5- Elongation terminale	72°C	10 min	72°C	7 min	72°C	10 min

Tableau C.6: Cycles PCR en fonction des organismes cibles (*Eubacteria* ou *Archaea*) et de la méthode (T-RFLP ou TTGE). Les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 30 fois.

■ Amplification PCR : La préparation des échantillons pour la PCR se réalise en conditions stériles (hotte UV). Les *Archaea* présentant en général un faible nombre de copies du gène codant pour l'ARNr16S sur le génome, alors que les *Bacteria* peuvent avoir jusqu'à 14 copies (**Pedersen et al. 1997, Madrid et al. 2001**), les séquences ARNr16S des *Eubacteria* et des *Archaea* ont été indépendamment amplifiées par des amorces spécifiques de ces deux domaines et des contrôles positifs et négatifs sont inclus pour chaque amplification. La composition du mélange réactionnel (volume final 50µl) est présenté Tableau C. 5. Les amplifications PCR sont réalisées sur un thermocycleur "MJ research PTC-200" (Tableau C.6). Afin de vérifier l'intégrité et la taille des produits PCR obtenus, 10 µl d'un mélange à volume égal de produit PCR et d'Acridine orange sont déposés sur gel d'agarose 1% (wt/vol). L'ADN est révélé avec du bromure d'éthidium (0.5 µg.ml⁻¹) et visualisé sous UV. Un standard de poids moléculaire permet de vérifier la taille de l'amplicon (1 kb ladder, Gibco, Cat N°:15615024). Le voltage de l'électrophorèse est compris entre 80 et 100 mV.

■ Purification su gel des produits PCR: Afin d'éliminer l'excédent d'amorces, les sels et les éventuels produits d'amplification non-spécifiques ; l'intégralité du produit PCR (45 µl) est déposé sur gel d'agarose 1%. A l'issu de l'électrophorèse (70 mV), les amplicons sont découpés sous UV. La purification des produits extraits du gel est réalisée avec le Kit de purification "QIAquick gel extraction Kit" (Qiagen).

■ Dosage des produits PCR: La TTGE et la T-RFLP étant des méthodes semi-quantitatives, il est essentiel de connaître la quantité de produit PCR utilisée pour l'analyse. Le dosage est réalisé par spectrofluorimétrie avec le Kit "DNA quantitation kit fluorescence assay" (Sigma).

(2) Etapes spécifiques de la TRFLP.

■ Digestion par des endonucléases de restriction: Les amplicons sont digérés par des enzymes de restriction tetramériques (Tableau C.7). Le mélange réactionnel contient : 100 ng d'ADN, 20U d'enzyme, 2,5µl de tampon 10X pour un volume final de 25 µl ajusté avec de l'eau distillée stérile. L'incubation est réalisée 12 heures à 37°C afin d'assurer une digestion complète des amplicons, les enzymes sont inactivées par chauffage (15 minutes à 65°C) et les volumes réactionnels sont ajustés à 50 µl (ED stérile) avant l'étape de déssalage.

ENZYME	SITE RECONNU
HhaI	5' G_CGC 3'
MspI	5' CCG_G 3'
RsaI	5' GT_AC 3'

Tableau C.7: Sites de coupure des enzymes de restriction utilisées

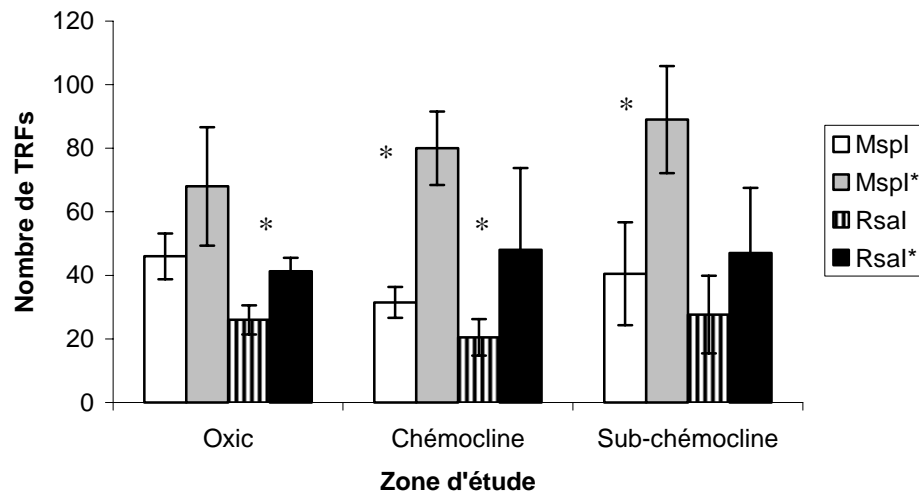


Figure C.9: Représentation du nombre de fragments de restriction (TRFs) en fonction de l'enzyme utilisée et du dessalage ou non des échantillons. 15 échantillons du monimolimnion du Lac Pavin sont intégrés dans cette analyse (profondeur 50 m à 90 m). MspI* et RsaI* représente les échantillons digérés respectivement par MspI et RsaI et ayant été dessalés. Par opposition MspI et RsaI représente les échantillons non dessalés. Le signe * au dessus des histogrammes indiquent une évolution statistiquement significative (ANOVA, $p \leq 0,05$)

- Urée 7M
- TAE 1,25 X
- Polyacrylamide 8% (Biorad)

Le mélange est placé 20 minutes sous vide (dégazage) afin de limiter la formation de bulles d'air dans le gel. Puis le catalyseur de polymérisation (Temed, 0,06 % concentration finale) et le polymérisateur (APS, Persulfate d'ammonium, 0.0625% final, Biorad) sont ajoutés.

Tableau C. 8 : Composition du gel de polyacrylamide

■ Dessalage des échantillons: L'analyse T-RFLP est réalisée par électrophorèse capillaire utilisant une procédure d'injection électrocinétique. La présence d'ions peut interférer lors de cette injection (en raison de l'injection préférentielle de molécules ionisées (ex : Cl)). Le dessalage des échantillons digérés est réalisé sur colonne Microcon YM30 (Amicon).

Afin de vérifier l'importance du dessalage sur la résolution de la T-RFLP, 15 échantillons issus de la colonne d'eau du Lac Pavin, repartis dans trois zones : la zone oxique (oxic), la Chémocline et la Sub-Chémocline ont été ou non dessalés après digestion enzymatique par MspI et RsaI (Figure C.9). Le dessalage des produits de digestion permet d'augmenter le nombre de pics détectés et donc accroît la résolution de la méthodologie. Cependant, le volume obtenu après passage sur colonne Microcon doit être contrôlé. En effet, une différence de volume peut conduire à une différence dans la quantité d'ADN digérés injectée dans le séquenceur capillaire et donc à une différence du nombre et de la hauteur des pics détectés.

■ Dépôt sur plaque, séquençage capillaire et traitement bioinformatique (uniquement pour la TRFLP) : 2,3 µl du produit de digestion dessalé est mélangé avec 0,5 µl du standard de taille GenScan-1000 ROX (Applied Biosystem) et 3,2 µl de formamide déionisé. Le mélange est déposé sur une plaque de 384 puits. Trois aliquots de l'échantillon sont déposés dans trois puits indépendants afin de mesurer le degré de variation entre les profils. Ces triplicats ne permettent d'évaluer qu'une erreur éventuelle au cours de l'électrophorèse capillaire. Avant l'injection, les échantillons subissent un cycle de dénaturation (94°C, 3 minutes), l'injection est réalisée à 7,7 KV pendant 40s. Les pics présentant une unité de fluorescence supérieure à 50 U sont analysés par comparaison avec le standard de taille en utilisant le logiciel GenScan (ABI).

(3) Etapes spécifiques de la TTGE

300 ng de produits PCR sont déposés sur gel de polyacrylamide 8% (Tableau C.8). L'électrophorèse est réalisée avec l'appareillage "D-code Universal mutation detection system" (Biorad), dans les conditions suivantes : 68V, incrément de 0,2°C par heure (66°C-69,7°C) pendant 17 heures dans du tampon TAE 1,25 X. A l'issue de l'électrophorèse, le gel est rincé 20 minutes dans du TAE 1,25X et incubé 60 minutes en présence de Gelstar Nucleic acid (0,5 X, Tebu Bio). La photographie du gel a été réalisée sous UV avec l'Analyser Versadoc (Imaging system, Biorad) et les profils TTGE obtenus ont été analysés (marquage des bandes, comparaison entre les pistes) avec le logiciel "Quantity one" (Biorad).

III. RESULTATS

ARTICLE I

Les communautés microbiennes anaérobies du Lac Pavin : Un lac méromictique unique en France.

Lehours Anne-Catherine, Corinne Bardot, Aurélie Thénot,
Didier Debroas, et Gérard Fonty.

Applied and Environmental Microbiology (2005), 71 :7382-7400.

Résumé : Cette étude a pour objectif d'analyser l'évolution de la composition des communautés d'*Eubacteria* et d'*Archaea* lors de la transition zone oxydée/zone anoxique dans la colonne d'eau du Lac Pavin, et de suivre finement la structure spatiale et la diversité de ces dernières dans le monimolimnion de cet écosystème. Une caractérisation des principaux paramètres physico-chimique a été établie, la diversité des communautés microbiennes a été analysée par la méthode de Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) et les densités des communautés d'*Eubacteria* et d'*Archaea* ont été déterminées par Fluorescent *in-situ* Hybridization (FISH). Une attention particulière a été accordée à la distribution spatiale des communautés de bactéries sulfato-réductrices (BSR) et d'*Archaea* méthanogènes (AM) intervenant dans les étapes terminales de la dégradation anaérobie de la matière organique. A cette fin, des sondes oligonucléotidiques ciblant différents niveaux taxonomiques ont été utilisées.

Les *Archaea* représentent le groupe procaryotique le plus abondant sur l'ensemble de la colonne d'eau étudiée avec un ratio moyen *Archaea/Eubacteria* de 1.5. L'analyse T-RFLP a révélé qu'une modification notable de la composition des communautés microbiennes était observée lors de la transition aérobie/anaérobie. D'autre part, la richesse phylotypique des communautés d'*Eubacteria* et d'*Archaea* est élevée dans la zone anoxique. Si la structure des communautés d'*Archaea* apparaît relativement homogène dans le monimolimnion, les *Eubacteria* présentent une distribution hétérogène des différents phylotypes, dont la grande majorité sont à des abondances relatives faibles à très faibles. Une co-occurrence des BSR et des AM dans le monimolimnion suggère que ces deux groupes métaboliques ne sont pas mutuellement exclusifs et que les BSR pourraient utiliser un métabolisme alternatif à la sulfato-réduction.

Appl Environ Microbiol. 2005 November; 71(11): 7389–7400.

doi: 10.1128/AEM.71.11.7389-7400.2005.

Copyright © 2005, American Society for Microbiology

Anaerobic Microbial Communities in Lake Pavin, a Unique Meromictic Lake in France†

Anne-C. Lehours*, Corinne Bardot, Aurelie Thenot, Didier Debroas, and Gerard Fonty

Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France

Received January 6, 2005; Accepted July 13, 2005.

ABSTRACT

The *Bacteria* and *Archaea* from the meromictic Lake Pavin were analyzed in samples collected along a vertical profile in the anoxic monimolimnion and were compared to those in samples from the oxic mixolimnion. Nine targeted 16S rRNA oligonucleotide probes were used to assess the distribution of *Bacteria* and *Archaea* and to investigate the in situ occurrence of sulfate-reducing bacteria and methane-producing *Archaea* involved in the terminal steps of the anaerobic degradation of organic material. The diversity of the complex microbial communities was assessed from the 16S rRNA polymorphisms present in terminal restriction fragment (TRF) depth patterns. The densities of the microbial community increased in the anoxic layer, and *Archaea* detected with probe ARCH915 represented the largest microbial group in the water column, with a mean *Archaea*/*Eubacteria* ratio of 1.5. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis revealed an elevated archaeal and bacterial phylotype richness in anoxic bottom-water samples. The structure of the *Archaea* community remained rather homogeneous, while TRFLP patterns for the eubacterial community revealed a heterogeneous distribution of eubacterial TRFs.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. Phone: (33)8473407751. Fax: (33)8473407670. E-mail: A-Catherine.LEHOOURS@univ-bpclermont.fr.

INTRODUCTION

Permanent anoxic basins are of great interest to microbial ecologists, and during the last decade several papers have been published on microbial assemblages from different marine anoxic basins (e.g., see references [42](#) and [36](#)). Among permanent anoxic aquatic systems, meromictic lakes are unusual and provide a special opportunity for research in aquatic biology for several reasons, e.g., the high physical stability of the water masses, clearly separated compartments, a relatively constant vertical stratification of bacterial populations, a compact and stable transition zone between the oxic mixolimnion and the anoxic monimolimnion, and in many cases the presence of a dense microbial community at the redox transition zone ([6](#)). These small and well-defined ecosystems can be useful for studying anaerobic microbial community structure and diversity and providing information on global carbon cycling and biogeochemical processes. Although molecular characterizations of microbial communities from Lake Sælenvannet ([31](#), [41](#)), Lake Cadagno ([6](#)), Mono Lake ([18](#)), and Mariager Fjord ([34](#), [40](#)) have been reported, the microbial populations and communities living in anaerobic zones of meromictic lakes remain largely unexplored. This paper focuses on the in situ distribution, abundance, and diversity of the *Bacteria* and *Archaea* communities in the anoxic zone of Lake Pavin, which has the advantage of being in a steady state ([28](#)). We have conducted culture-independent studies of the anoxic water column of Lake Pavin and of samples collected from the oxic zone to provide comparative information. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and fluorescent in situ hybridization analyses were performed on samples from between 50- and 90-m depths to characterize the microbial assemblages using 16S rRNA genes. Because previous geochemical studies ([28](#)) have shown high concentrations of end products (methane, carbon dioxide, and sulfide) of the terminal steps of anaerobic degradation of organic material in the monimolimnion, we have focused on the in situ occurrence of sulfate-reducing *Bacteria* (SRB) and methane-producing *Archaea* (MPA). Our results show significant differences in the compositions of microbial assemblages at different depths under stratified conditions and reveal distinct diversity patterns not only in oxic versus anoxic water zones of the lake but also within the anoxic depth profile.

MATERIAL AND METHODS

Description of study site and sampling procedures.

Lake Pavin, located at 45°55'N and 2°54'E, is the youngest volcano crater lake in the French Massif Central (6,000 years BP). Lake Pavin has a circular shape, an area of 0.44 km², and a maximum depth of 92 m at an elevation of 1,197 m above sea level. It is characterized by the presence of two permanent stratified layers. The upper layer (mixolimnion) extends from the surface to a 60-m depth (see Fig. S2 in the supplemental material) and is affected by mixing during fall and spring. The deepest layer (monimolimnion) extends from 60 to 90 m in depth and includes the chemocline (60- to 70-m depth). Water samples were collected in March 2002 from 15 depths along a vertical profile (between 50 and 90 m) with an 8-liter horizontal Van Dorn bottle. Depth profiles of the water temperature ($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$), oxygen concentration ($\pm 0.03 \text{ mg liter}^{-1}$, $\pm 0.2\%$), and pH were determined in situ by using a portable multisensor probe (WTW). Concentrations of dissolved major elements (except ferrous iron) were measured by colorimetric techniques using a spectrophotometer according to the manufacturer's instructions (Hach Kits). Ferrous iron [Fe(II)] was analyzed by the orthophenanthroline method (20). Gases from bottom water were collected (see Fig. S1 in the supplemental material) using a methodology developed by the Laboratory of Geochemistry (University of Paris VII) (28). Methane and carbon dioxide concentrations were measured with a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (DI 700; Delsi).

In situ hybridization.

Nine oligonucleotide probes (Table 1) were synthesized commercially (MWG Biotech Ltd., Milton Keynes, United Kingdom) and end labeled with indocarbocyanine fluorescent dye (Cy3). Sample preparations and hybridizations were performed as previously described (14). Specific hybridization conditions for probes are indicated in Table 1. Between 400 and 600 bacteria stained with fluorescent probes were counted on each hybridized filter (magnification, x1,000). DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) counts were used as a reference for the subsequent community analysis with group-specific probes (data are expressed as percentages of DAPI counts).

Probe or primer	Sequence (5' 3')	Target	% Formamide ^a	NaCl concn (mM) in washing buffer	T _d ^b	Reference
Probes						
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	35	80	46	1
ARCH915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	<i>Archaea</i>	20	200	46	38
SRB 385R	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	SRB (- <i>Proteobacteria</i>)	35	88	46	34
660R	GAATTCCTCTTCCCTCTG	<i>Desulfobulbus</i>	60	15	46	13
129F	CAGGCTTGAAGGCAGATT	<i>Desulfobacter</i>	20	15	46	13
687R	TACGGATTTCCTCCT	<i>Desulfonitro</i>	10	15	46	13
MB1174	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	<i>Methanobacteriaceae</i>	40		62	35
MSMX860	GGCTCGCCTCACGGCTTCCCT	<i>Methanosarcinaceae</i>	40		60	35
MG1200	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	<i>Methanomicrobiaceae</i>	40		53	35
Primers						
21f	TTCGGGTGATCCYGCCGGA	<i>Archaea</i>				5
958r	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	<i>Archaea</i>				5
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	<i>Eubacteria</i>				18
1492r	TACCTTGTACGACTT	Universal				18
907r	CCGTCAATTC(AC)TTT(AG)AGTTT	Universal				9

^a Formamide concentration in hybridization buffer. ^b Hybridization temperature (°C).

TABLE 1. Oligonucleotide probes and primers used for in situ hybridization analyses and PCR reactions

DNA extraction.

One-hundred-milliliter water samples were filtered on-site onto 0.2- μ m-pore-size polycarbonate filters (GTP; Millipore) and stored at -80°C before extraction. The extraction procedure was performed as previously described (3, 19). DNA extracts were quantified with a DNA quantitation fluorescence assay kit (Sigma).

PCR conditions.

Primers 27f and 21f were 5' labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM), a fluorescent sequencing dye (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA). Target genes were selectively amplified from the genomic DNA by PCR, as follows. The archaeal 21f-FAM, archaeal 958r, and universal 907r primers were used to amplify the archaeal 16S rRNA genes. The bacterial primer 27f-FAM was used in combination with the universal primers 1492r and 907r to selectively amplify the bacterial 16S rRNA genes (Table 1). Reaction mixtures contained 5 μ l of 10x buffer, 2 mM MgCl_2 , a 200 μ M concentration of each deoxyribonucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; Eurobio), 1.25 U of *Taq* II DNA polymerase (Eurobio), 10 pmol of each oligonucleotide primer, and 50 ng of template DNA in a final volume of 50 μ l. DNA amplification was performed with a model PTC-200 cycler (MJ Research) by using the following program: a 5-min hot start at 95°C followed by 30 cycles consisting of denaturation (1 min at 95°C), annealing (1 min at 55°C), and extension (1 min at 72°C) and a final extension at 72°C for 10 min. Amplified DNAs were checked by electrophoresis in 1.0% agarose in 1x Tris-borate-EDTA buffer, and amplicons in the proper size range were cut out, purified with a QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Basel, Switzerland), and eluted in a final volume of 50 μ l.

16S rRNA gene TRFLP analysis.

Enzymatic digestion reaction mixtures contained 100 ng of labeled DNA (19) and were incubated for 12 h at 37°C . The 25- μ l reaction mixtures contained 20 U of *Rsa*I, *Msp*I, and *Hha*I (Sigma) in the manufacturer's recommended reaction buffer. The inactivated restriction digests (by heating to 65°C for 10 min) were purified and desalted using Micropure EZ-Microcon 30 columns (Millipore) to prevent ion interference with the uptake of DNA by electrokinetic injection (29). The volume after EZ column purification was checked for all samples to reduce bias resulting from differences in the volume of the column eluant, which could lead to large differences in the mass loaded into the sequencer (and consequently to large differences observed in detectable peaks). The fluorescently labeled terminal restriction fragments (TRFs) were analyzed on an ABI

3700 automated sequence analyzer (Applied Biosystems) in GeneScan mode. The restriction enzyme digestion mixture (2.3 µl) was mixed with 0.5 µl of GeneScan-1000 ROX size standard (Applied Biosystems) and 3.2 µl of deionized formamide, followed by denaturation at 94°C for 3 min. Injection was performed electrokinetically at 7.7 kV for 40 s. Three replicate TRF profiles were obtained from the digested DNA by loading three aliquots of digested DNA on three different capillaries. Replication at this level was performed to measure the degree of variation in TRF profiles arising solely as a result of experimental error during electrophoresis of digested DNA samples.

Analysis of TRF profiles.

For each sample, peaks over a threshold of 50 units above background fluorescence were analyzed by aligning fragments with the size standard by using GeneScan software (ABI). To avoid the detection of primers and uncertainties of size determination, TRFs smaller than 50 bp and larger than 800 bp were excluded. Replicate profiles of each sample were compared to identify the reproducible fragments (peaks that appeared in at least two replicate profiles of a sample). Only reproducible TRFs were considered in the numerical analysis, and TRFs that differed by <1 bp were considered identical and were clustered. The profiles generated by TRFLP analysis can vary in two ways. First, there can be variation in the number and sizes (in base pairs) of TRFs present in the profile. Secondly, variation can be found in the height (and consequently the area) of any particular peak. The relative abundance of TRFs was determined by calculating the ratio between the peak height of each peak and the total peak height of all peaks within one sample. Ratios were converted into percentages, and the results are displayed as histograms. Additionally, TRFLP profiles were analyzed by the presence or absence of TRFs (converted to binary data), and the similarity of the patterns was calculated using correspondence analysis (COA) computed with R software using the ADE4 package for COA analysis (<http://cran.r-project.org/>). Phylotype richness (S) was calculated as the total number of distinct TRF sizes in a sample. The Shannon-Weiner diversity index (25) was calculated as follows: $H = - \sum (p_i) (\log_2 p_i)$, where p is the proportion of an individual peak area relative to the sum of all the peak areas. Correlation coefficients were determined using the R coefficient of Pearson. Statistical analyses of S and H evolutions were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), using Minitab software, version 12.

Depth (m)	Concn of compound					
	DOC ^a	CO ₂	CH ₄	Fe(II)	P-PO ₄ ²⁻	N-NH ₄ ⁺
50	3.8	0	0	0		0
55	2.8	0	0	0		0
57	2.5	0	0	0		
60	6.2	1.7	5	0	16.1	72.1
62	2.5	3.7	16.5	127.7	26.1	45
64	3.6	7.7	19.9		36.1	93.6
66	4.3	10.6	27	179.1	185.8	100.7
68	9.3	10.9	53.1	315.7	58.1	177.1
70	9.4	10.6	57.5	367.8	197.4	576.4
72	8	15.3	57.2	29.3	243.9	507.8
75	6	16.2	78.3	141.1	93	280.7
80	8.8	12.4	75		113.2	362.1
85	4.5	23.8	95.3	123.7	103.2	319.3
90	7.4	25	100	296.3	346.8	456.4

^aConcentrations of DOC are given in mg/liter, those of methane and CO₂ are given in ml/liter, and those of Fe(II), phosphorus, and ammonia are given in micromolar units.

TABLE 2. Concentrations of dissolved compounds in Lake Pavin by depth

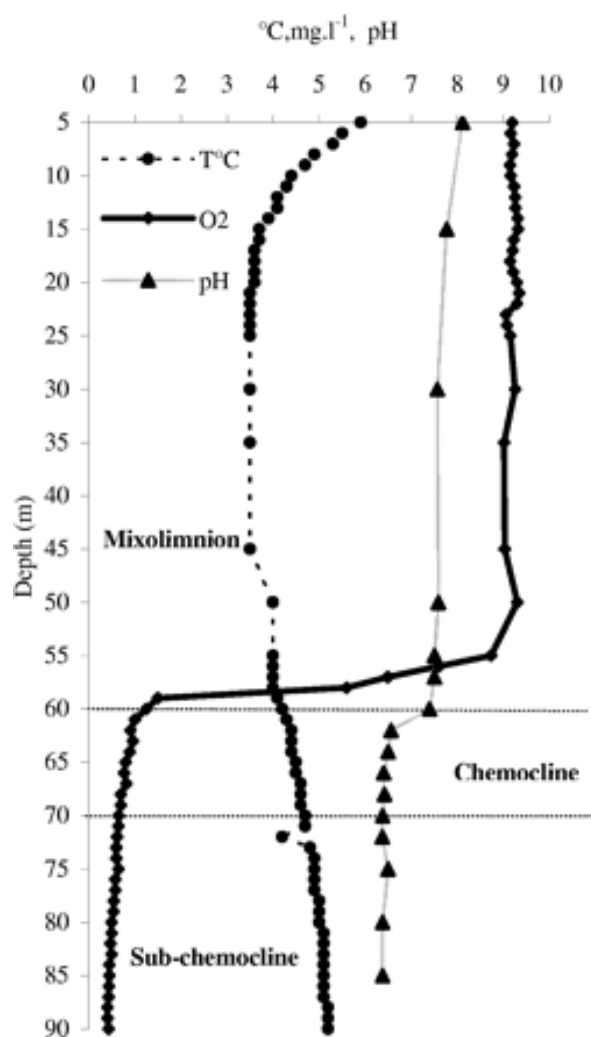


FIG. 1. Depth profiles of temperature (°C), oxygen (mg liter⁻¹), and pH in water column of Lake Pavin on 18 March 2002.

RESULTS

Characteristics of Lake Pavin.

The anoxic zone extended from 60 m to 92 m (including the chemocline and subchemocline), and a steep oxycline was evident between 55 m and 60 m. The temperature increased with depth in the anoxic zone, from 4°C at 60 m to 5.2°C at 90 m. The pH reached 7.5 in epilimnetic water and decreased in the anoxic zone to 6.5 (Fig. 1). The mean dissolved organic carbon (DOC) content of the monimolimnion between 60 and 90 m was higher (6.3 mg liter⁻¹) than that of the oxic zone sampled (3 mg liter⁻¹). The DOC concentrations peaked at 68 m and 70 m (9.3 mg liter⁻¹) and at 80 m (8.8 mg liter⁻¹) (Table 2). Methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) were first detectable at 60 m and increased with depth (Table 2). In the 60- to 90-m water column, the CH₄ concentrations ranged from 5 cm³ liter⁻¹ to 100 cm³ liter⁻¹, and CO₂ concentrations ranged from 1.7 cm³ liter⁻¹ to 25 cm³ liter⁻¹. Dissolved ferrous iron (Fe²⁺) was undetectable above a 62-m depth. Below 62 m, the Fe(II) concentrations presented broad peaks in the chemocline, with a prominent peak of 367.8 µM at 70 m. The NH₄⁺ (Table 2) profile showed an increase with depth and a prominent peak of 576.4 µM at 70 m. Bacterial numbers (Fig. 2) based on microscopic counts ranged from 5.2 x 10⁶ to 1.2 x 10⁷ cells ml⁻¹, with the largest number found in the anoxic zone.

Effect of depth on microbial community structure.

Cells hybridized with probes EUB338 and ARCH915 revealed large prokaryotic populations (>10⁶ cells ml⁻¹) in the water column (Fig. 2). However, the total bacterial and archaeal cells detected by these probes were <50% of the DAPI-stained cells. The mean densities of cells detected with probe EUB338 were 9% for the oxic layer (0.6 x 10⁶ cells ml⁻¹), 14.2% for the chemocline (1.2 x 10⁶ cells ml⁻¹), and 16.7% (1.8 x 10⁶ cells ml⁻¹) for the subchemocline. Cells identified with the ARCH915 probe represented the largest microbial group in the water column, with a maximum percentage for the chemocline (21% of DAPI-stained cells; 1.7 x 10⁶ cells ml⁻¹). They accounted for 14.5% of DAPI-stained cells in the oxic layer (0.9 x 10⁶ cells ml⁻¹) and for 17% in the subchemocline (1.8 x 10⁶ cells ml⁻¹). Like *Eubacteria*, *Archaea* reached their highest densities at 85 m (2.4 x 10⁶ cells ml⁻¹). The ratio of *Archaea* to *Eubacteria* ranged from 0.8 to 4.1 (mean ratio, 1.5), with distinct maxima at 57 m and 68 m (4.1 and 2.7, respectively). Sulfate-reducing members of the δ-subclass of *Proteobacteria* targeted with the probe SRB385R were detected within the entire water column (Fig. 3) but were more dominant in the chemocline, with a maximum of 44% of *Eubacteria* counts (mean levels, 0.6 x 10⁵ cells ml⁻¹ in the oxic layer, 3.2 x 10⁵ cells ml⁻¹ in the chemocline, and 0.8 x 10⁵ cells ml⁻¹ in the subchemocline).

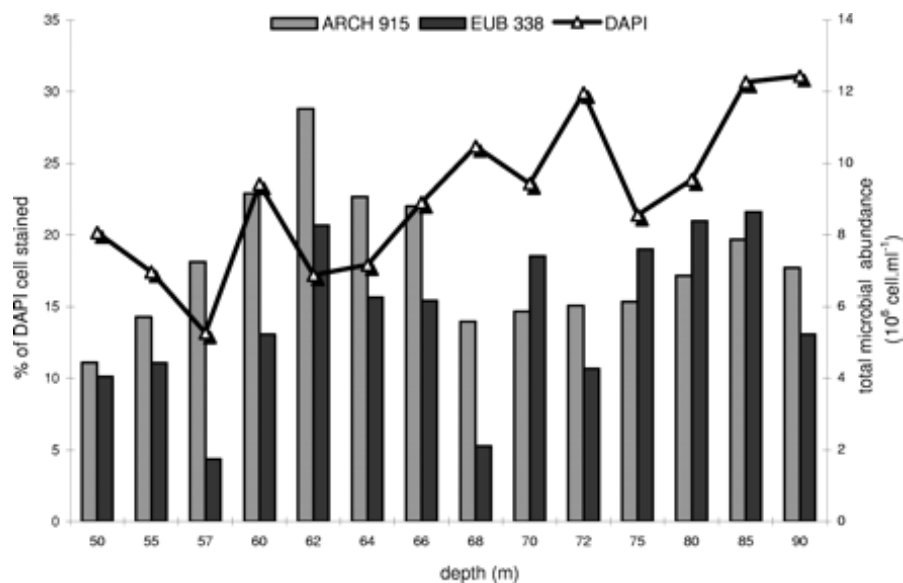


FIG. 2. Total microbial cell counts ($10^6 \text{ cells ml}^{-1}$) and relative percentages of cells that hybridized with the EUB338 and ARCH915 probes (expressed as % of DAPI-stained cells).

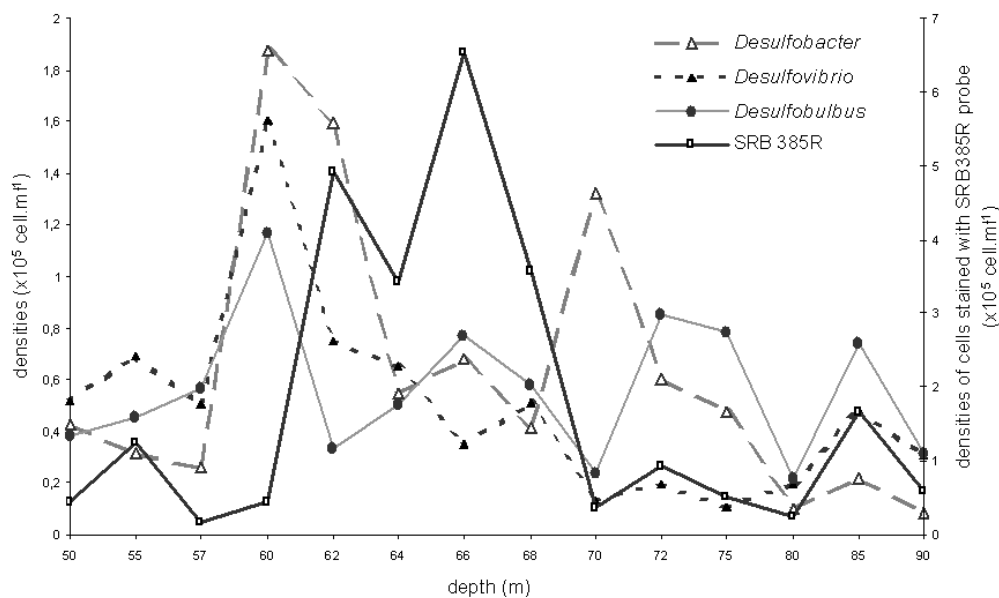


FIG. 3. Profiles of cell counts stained with SRB385R (SRB belonging to δ subdivision of *Proteobacteria*), 129F (*Desulfobacter*), 660R (*Desulfobulbus*), and 687R (*Desulfovibrio*) probes ($10^5 \text{ cells ml}^{-1}$).

Large numbers of target cells ($>10^5$ cells ml^{-1}) were found with the *Desulfobacter* 129F, *Desulfovibrio* 687R, and *Desulfobulbus* 660R probes (Fig. 3), and maximum abundances occurred at the oxic-anoxic interface (*Desulfobacter*, 1.8×10^5 cells ml^{-1} ; *Desulfovibrio*, 1.6×10^5 cells ml^{-1} ; and *Desulfobulbus*, 1.2×10^5 cells ml^{-1}). However, in comparison with the distribution of cells detected with the SRB385R probe, these genera described only a small fraction of the SRB inhabiting the chemocline.

Methanosarcinales (including *Methanosaeta* and *Methanosarcina*) detected by the MSMX860 probe accounted for 0.6% of the archaeal community in the oxic layer, 2.8% in the chemocline, and 4.8% in the subchemocline (Fig. 4). The *Methanomicrobiales*, detected by the MG1200 probe, peaked at 80 m (1.4×10^5 cells ml^{-1}) but were almost negligible in the rest of the water column. In contrast, the *Methanobacteriales*, detected by the MB1174 probe, were most dominant at the interface of the oxic and anoxic parts of the water column (28% of the *Archaea* at 60 m).

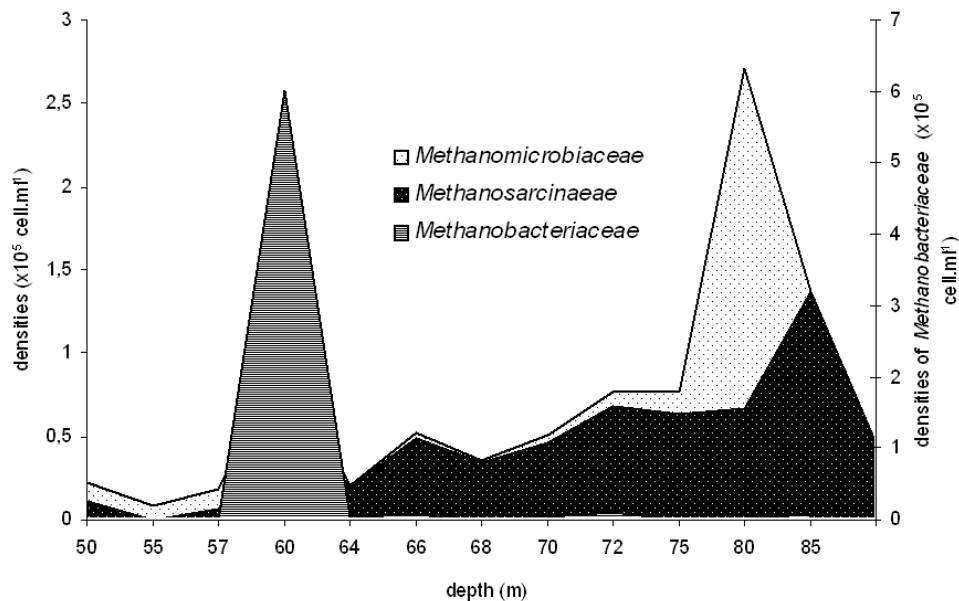


FIG. 4. Profiles of cell counts stained with MB1174 (*Methanobacteriaceae*), MSMX860 (*Methanosarcinaceae*), and MG1200 (*Methanomicrobiaceae*) probes (10^5 cells ml^{-1}).

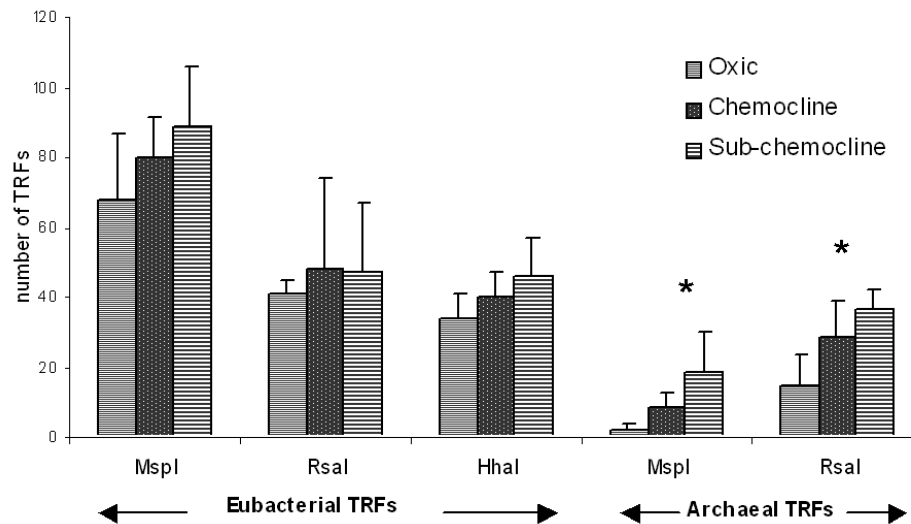


FIG. 5. Evolution of eubacterial and archaeal phylotype richness (S = number of TRFs) between the three zones studied for each independent restriction digest. *, statistically significant evolution (ANOVA analysis; $P < 0.05$).

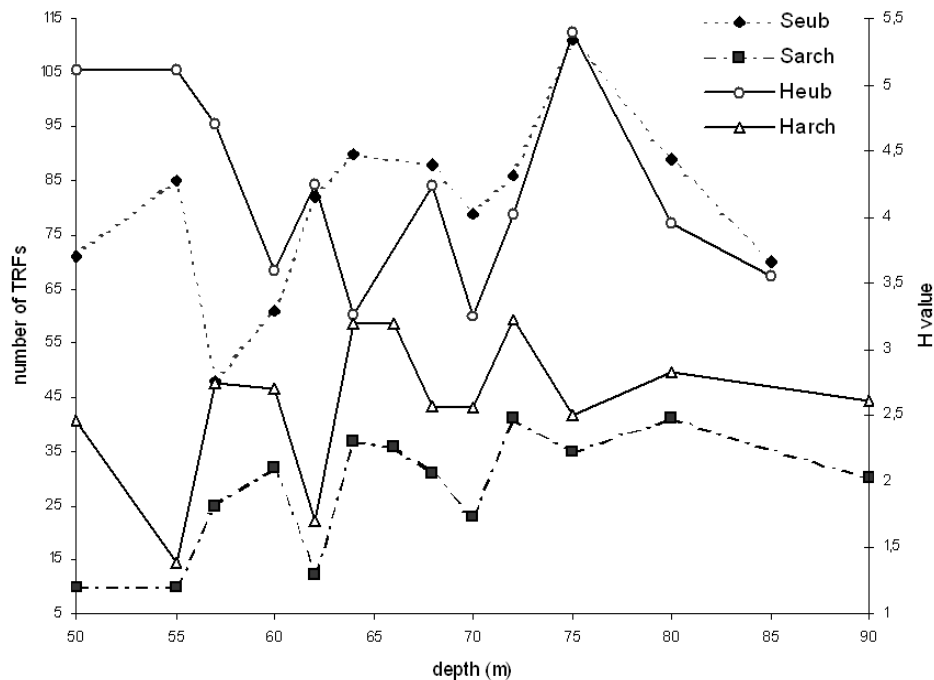


FIG. 6. Spatial evolution of phylotype richness (S) and Shannon-Weiner indexes (H) for eubacterial (S_{eub} , H_{eub} ; MspI digestion) and archaeal (S_{arch} , H_{arch} ; RsaI digestion) communities.

Diversity of 16S rRNA genes.

Eubacterial and archaeal 16S rRNA genes were digested with three (MspI, RsaI, and HhaI) and two (MspI and RsaI) separate single enzymes, respectively. Each individual cleavage reaction for each group showed the same trend (Fig. 5): the phylotypic richness (S = number of TRFs) of eubacterial (S_{eub}) and archaeal (S_{arch}) communities increased in the anoxic zone, with a maximum number of TRFs in the subchemocline. Differences in S values between the three zones were significant for archaeal communities ($P < 0.05$); however, if the same trend was observed with the three independent restriction digests, no significant statistical differences were observed for S_{eub} .

The results obtained with MspI for *Eubacteria* and with RsaI for *Archaea* yielded the largest numbers of TRFs and thus presented the highest level of resolution (8), and for further analyses, the results presented are those obtained with these restriction digests.

A greater total number of eubacterial TRFs (350; MspI digestion) than of archaeal TRFs (101; RsaI digestion) was observed. S values for both eubacterial and archaeal TRF profiles revealed a substantial richness in the anoxic layer (Fig. 5), especially in the subchemocline ($S_{\text{eub}} = 89$ [MspI]; $S_{\text{arch}} = 37$ [RsaI]). Phylotype richness profiles (Fig. 6) show intrazone variability for both S_{arch} (e.g., 12 TRFs at a 62-m depth and 37 TRFs at a 64-m depth) and S_{eub} (e.g., 85 TRFs at a 55-m depth and 48 TRFs at a 57-m depth). The maximum value for S_{eub} was obtained at a 75-m depth ($S_{\text{eub}} = 111$), whereas no significant increase was observed for S_{arch} at this location.

Comparison of bacterial and archaeal communities.

TRFLP profiles were compared on the basis of the presence or absence of TRFs by COA. The COA obtained with archaeal 16S rRNA gene patterns (Fig. 7b) showed a clear distinction between two sets on the horizontal axis (the more discriminant axis). One set grouped samples from the oxic points (50, 55, and 57 m) with the upper points of the chemocline (60 m and 62 m). The second cluster illustrated a striking relationship for anoxic samples between 64 and 90 m. The COA result obtained with eubacterial TRFs (Fig. 7a) was quite similar to that obtained with archaeal TRFs, except for the results for 75-m and 80-m depths. At these anaerobic depths, the eubacterial TRFs did not cluster with those for other anoxic points.

A determination of the number of TRFs specific to one zone revealed that 7% of eubacterial and 12% of archaeal TRFs were specific to the oxic layer, while 61% of eubacterial and 67% of archaeal TRFs occurred exclusively in the anoxic zone. For both *Eubacteria* and *Archaea*, some TRFs differed between the chemocline and the subchemocline (19% of eubacterial TRFs and 23% of archaeal TRFs were specifically restricted to the chemocline, while 21.5% of eubacterial TRFs and 14% of archaeal TRFs were restricted to the subchemocline).

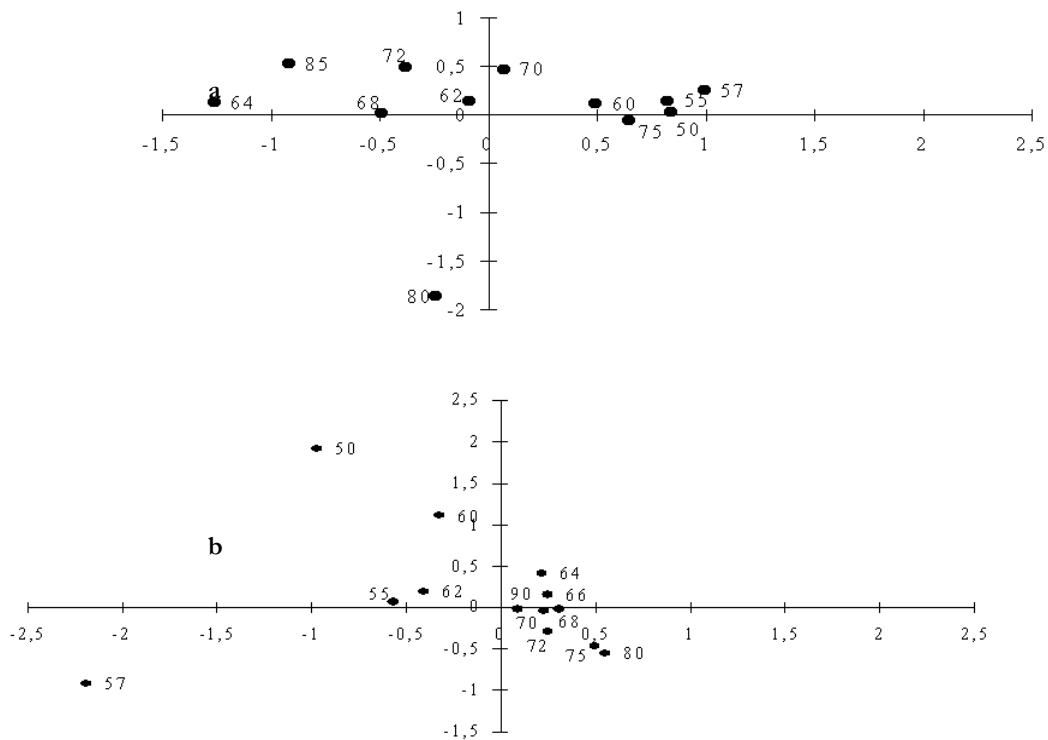


FIG. 7. COA analyses of TRF relationships between sample locations. (a) Eubacterial TRFs from MspI cleavages. (b) Archaeal TRFs from RsaI cleavages.

Evaluation of bacterial and archaeal communities.

TRFLP profiles were compared by calculating the relative abundances of individual TRFs within samples. Histograms are displayed for fragments with relative abundances of >1% (Fig. 8). No eubacterial TRF (>1%) was found in all sampled depths, whereas the 94-bp dominant TRF (16 to 64%) was common to all archaeal communities. Twelve archaeal fragments (e.g., 96 bp at 62 m and 190 bp and 577 bp at 50 m) occurred exclusively at one depth, but no large single fragment dominated at any one sample location. For *Eubacteria*, 29 fragments were restricted to one depth, with four dominant fragments among them (71 bp [17%] at 57 m, 146 bp [30%] at 80 m, 154 bp [20%] at 70 m, and 510 bp [27%] at 64 m). Some TRFs, such as the eubacterial 97-bp TRF between 55 and 62 m and the 93-bp archaeal TRF from 64 m to 90 m, were characteristic of successive sample locations. The most obvious changes within the community structure involved the *Eubacteria*, while the archaeal community remained rather stable. The oxic-anoxic layer transition was characterized by a striking change in the eubacterial community pattern. In the oxic zone, no very dominant eubacterial TRFs occurred, while the anoxic zone (specifically the chemocline) was dominated by a few phylotypes (e.g., the 505-bp and 506-bp TRFs at 60 m and

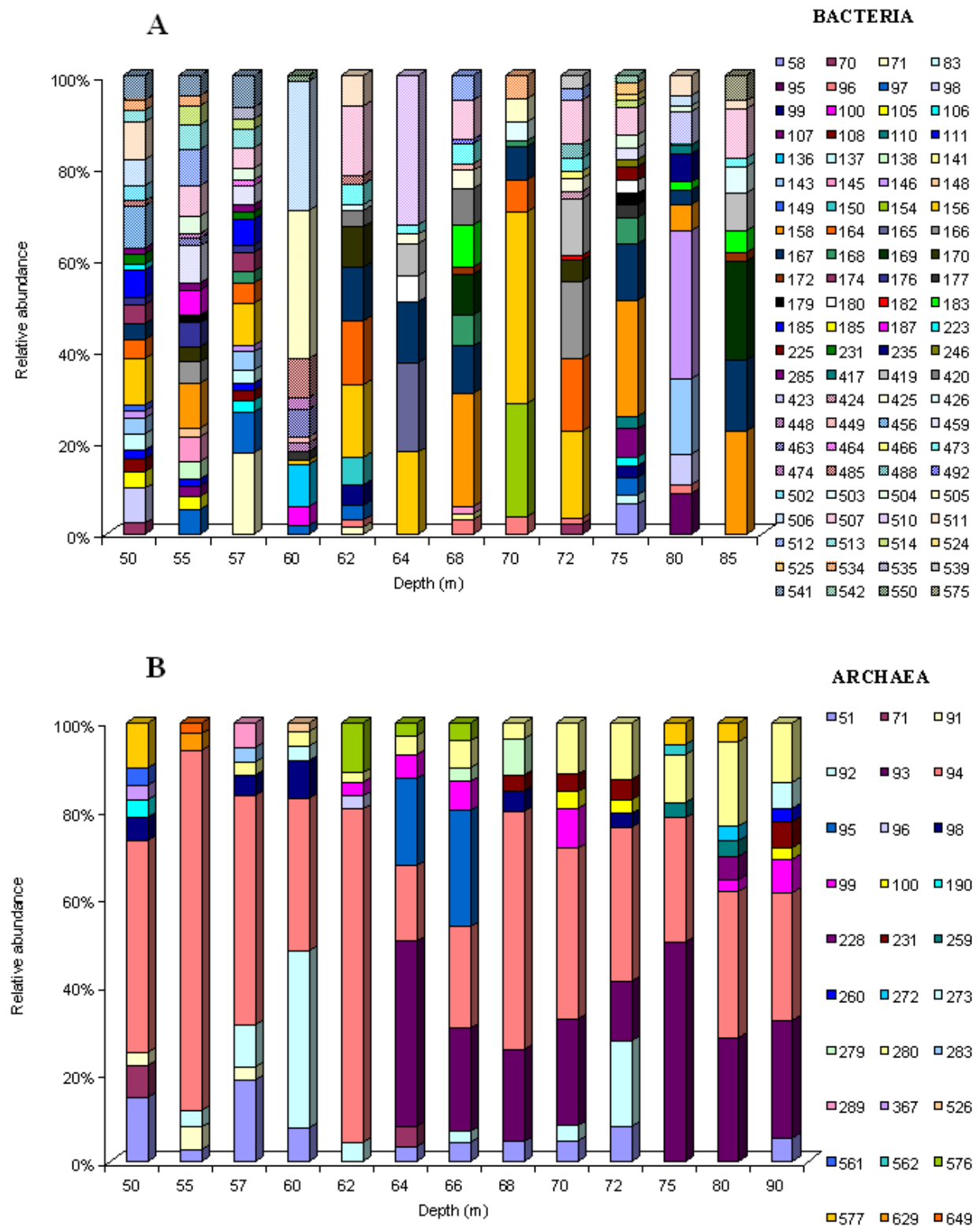


FIG. 8. Relative abundances of TRFs from bacterial (A) and archaeal (B) 16S rRNA genes. Diagrams show the results after cleavage with MspI (bacteria) and RsaI (archaea). Numbers in the keys indicate the lengths of the TRFs, in base pairs, for fragments with a relative abundance of >1%.

the 154-bp and 156-bp TRFs at 70 m represented 69% and 53%, respectively, of the relative abundances).

To compare communities by considering two parameters, the relative abundance of terminal fragments (richness) and the communities' relative abundances (evenness), the Shannon-Weiner index was calculated for eubacterial (H_{eub}) and archaeal (H_{arch}) communities. The different independent eubacterial or archaeal restriction digests showed the same trend (Fig. 9). For *Archaea*, an increase in H_{arch} was observed between the three zones, and H_{arch} highly significantly reflected S_{arch} ($r = 0.82$; $P < 0.01$) (Fig. 6), unlike the case for *Eubacteria*, where a decrease in H_{eub} was noticed in the chemocline (for MspI digestion, $P < 0.05$) (Fig. 9). H_{eub} indicated an opposite trend from that of S_{eub} , suggesting that the bacterial communities were less diverse in the chemocline (Fig. 6) than those from the oxic environment (e.g., for MspI digestion, H_{eub} [oxic zone] = 5 and H_{eub} [chemocline] = 3.7).

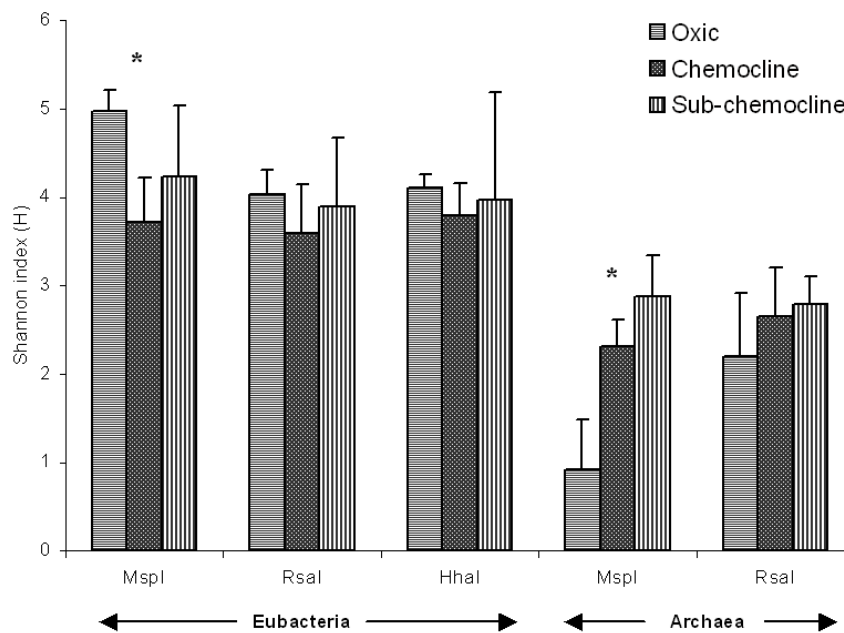


FIG. 9. Evolution of eubacterial and archaeal Shannon-Weiner indexes (H) between the three zones studied for each independent restriction digest. *, statistically significant evolution (ANOVA analysis; $P < 0.05$).

DISCUSSION

In this study, the microbial diversity and community structure within the water column in the meromictic Lake Pavin were estimated. The microbial ecology of such lakes is of specific interest because the chemocline is believed to spatially separate distinct microbial communities. Moreover, previous geochemical studies of Lake Pavin have shown that the monimolimnion is in a steady state (28). This ecosystem appears to be an ideal site to investigate the diversity, distribution, and function of bacterioplankton because spatial variations in microbial communities should be addressed to the strong and persistent chemical gradient. This lake is also an anomalous environment in that it has high concentrations of DOC and dissolved inorganic phosphorus and high standing crops of bacteria.

Due to the poor culturability of natural bacteria, particularly anaerobic bacteria, we have used molecular approaches based on 16S rRNA genes to investigate the microbial community structure in the water column of Lake Pavin. TRFLP analysis has been demonstrated to be a robust and reproducible methodology for the rapid analysis of microbial community structures in different samples and for the study of community dynamics and changes in community structure in response to changes in prevailing physicochemical parameters (30). However, the observation of Wintzingerode et al. (44), who state that "each physical, chemical and biological step involved in the molecular analysis of an environment is a source of bias which will lead to distorted view of the real world," is as applicable to this technique as to any of the other methodologies currently used in microbial ecology. We caution that data obtained by using TRFLP analysis contain several sources of potential bias, especially for semiquantitative analysis. For example, the number of populations represented in the fingerprint of any given community depends on the rank abundance of each population. Microbial populations that are not numerically dominant are not represented because the template DNAs from these populations represent a small fraction of the total community DNA. Consequently, the species diversity of the microbial community is underestimated (23). Differences in gene copy number between species (organisms belonging to the domain *Eubacteria* can have one to seven or more copies of the 16S rRNA gene [32]) and bias introduced during cell lysis, DNA extraction, and PCR amplification may yield a mixture of products that do not accurately reflect the rank abundance of the original community DNA template, thus skewing the apparent abundance of different populations. To minimize deviations between samples, the protocol for TRFLP analysis was standardized (e.g., the number of cycles of PCR, the use of a capillary-based electrophoresis system with automated sample loading [30], and

analysis of the 5'-end region of the gene, which provides greater discrimination [39]) in this study to yield high-quality fingerprints.

A conclusive result of our study is the complete shift in the composition of the microbial assemblages between the mixolimnion and the monimolimnion, as shown by COA analyses. One cluster grouped together the upper depths (except for 75 m for eubacterial TRFs), and the second cluster illustrated a striking relationship (especially for *Archaea*) between deep anoxic sample locations. Few phylotypes found in the oxic layer were recovered in the monimolimnion (61% of eubacterial TRFs and 67% of archaeal TRFs were characteristic of the anoxic zone). The results were in agreement with the drastic stratification of the environment and clearly separated two microbial communities. Relative to what has been found for other anoxic environments (6, 18, 24, 42), the global diversity of the Lake Pavin monimolimnion is quite elevated, as indicated by the phylotype richness values and diversity index that we calculated. TRFLP analysis performed with *Eubacteria* (MspI) yielded between 50 and 90 peaks for most profiles (Fig. 6). These results are very similar to those of Vetriani et al. (42) for the Black Sea, who also noticed that the diversity of *Archaea* in the Black Sea appeared to be quite low compared to the bacterial diversity. Within the Lake Pavin water column studied, diversity seems to be higher in anoxic deep water than in oxic sample locations. For *Archaea*, the number of TRFs was twice as large for the subchemocline samples (for RsaI digestion, $P < 0.05$) as for the oxic samples. This tendency was also noticed for *Eubacteria*: the oxic layer contained on average 68 eubacterial TRFs, and the deep anoxic water contained 89 eubacterial TRFs (MspI digestion). This trend was observed for the three independent restriction digests, suggesting that S_{eub} tends to increase in the anoxic layer. These conclusions are in contrast to those of previous studies of Mono Lake assemblages based on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis (17) or of a similar DGGE-based study of Lake Sælenannet (31), which revealed greater specific diversity in the oxic zones. However, our results are in agreement with those of Madrid et al. (24) and Humayoun et al. (18), who also found more bacterial diversity in anoxic deep water than in oxic surface water. Nevertheless, care must be taken when comparing bacterial diversity in the oxic and anoxic zones defined in our study. Our sampling points in the oxic zone reflect only part of the mixolimnion, which is subjected to marked seasonal variations in its upper part (light intensity, temperature, and nutrient loading) which can lead to temporal variations in the number of TRFs. Boucher et al. (7) revealed that between 69 and 133 and between 71 and 102 eubacterial TRFs occurred in the epilimnion and the metalimnion, respectively, of Lake Pavin (with MspI digests), suggesting that the eubacterial diversity in anoxic bottom water is quite similar to that found in the upper part of the water column. A likely explanation, postulated by Humayoun et al. (18), for the discrepancy

between studies based on DGGE analysis (17, 31) and those based on methods with a higher resolution, such as cloning-sequencing approaches (18, 24) or TRFLP (29), on the diversity of anoxic versus oxic layers is that most phylotypes found in deep water were present at a very low relative abundance and thus formed faint bands that were not readily detected by DGGE. This hypothesis is consistent with our data which indicate the presence of sparsely occurring eubacterial phylotypes, especially in the chemocline (as revealed by the noncorrelation between H_{eub} and S_{eub} [$r = 0.13$; $P < 0.05$]) (Fig. 6). A few TRFs dominated the chemocline, as shown in Fig. 8 (e.g., at the 70-m depth 79 TRFs were observed, and among them, the 154- and 156-bp TRFs represented 53% of the total peak area). A highly diverse microbial community dominated by a few species was also observed in the chemocline of Lake Cadagno (6), and Holfe and Brettar (16) found the largest number of dominant taxa in the biologically most active regions of the water column. These observations suggest a preponderant role for the interface community within the chemocline in the overall functioning of Lake Pavin. The present study shows a prevalence of *Archaea* throughout the water column, and their presence in the oxic zone agrees with the statement that they are much more diverse and widespread than was previously suspected. Representatives have been detected in terrestrial environments, marine and lake sediments, temperate ocean waters, and polar seas (10). Delong et al. (12) and Massana et al. (27) have shown that planktonic *Archaea* occur at a high relative abundance in the oceanic subsurface, and this group has been shown to dominate the prokaryotic fraction in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean (21). Additional evidence demonstrating the wide distribution of *Archaea* in oxic and anoxic marine sediments and in the water column has been obtained by using lipids as biological markers for the detection of these microorganisms (11, 15). However, if *Archaea* appear to be an essential part of the prokaryotic assemblages in the water column of Lake Pavin, our observations may have arisen in part because of a lack of specificity of the ARCH915 domain probe, which has been shown to hybridize nonspecifically to some members of the *Eubacteria* (33). The presence of archaeal TRFs in oxic locations confirms that *Archaea* occurred in the oxic layer of Lake Pavin. These archaeal TRFs were clearly discriminated from those of the deeper layer, suggesting that these species exhibit particular phenotypic characteristics. Vetriani et al. (42) noticed that the upper-depth profiles for depths above the chemocline of the Black Sea were largely colonized by members of the marine planktonic group II (related to the order *Thermoplasmatales*). They also found that in contrast to the relative homogeneity of the *Archaea* found in the oxic upper water column of the Black Sea, the deeper anoxic profile revealed a more complex structure. In the water column of Lake Pavin, we have noticed a significant increase in archaeal TRFs, but relative homogeneity in the structure of this community was observed

throughout the water column (Fig. 8). The significant increase in the number of archaeal TRFs in and below the chemocline is consistent with the observations of Ovreas et al. (31) and with the known phenotypic characteristics of these organisms, which in mesophilic habitats are predominantly anaerobic methanogens. If the increase of S_{arch} for the deeper anoxic points appears to be in agreement with the intrinsic characteristics of these organisms, at this state of the study of anaerobic microbial communities of Lake Pavin we can only formulate a hypothesis to explain the high global diversity observed for *Eubacteria*. Geochemical studies have shown that the Lake Pavin monimolimnion exhibits a wide diversity of dissolved or particulate compounds, such as manganese, particulate ferric and ferrous iron, copper, sulfate, and different trace elements such as molybdenum, uranium, vanadium, mercury, etc. (43). The strong physicochemical gradients in the Lake Pavin monimolimnion no doubt contribute to the overall diversity of the bacterioplankton in the lake by supporting a range of redox environments (niches). No significant correlations have been found between the spatial occurrence of eubacterial TRFs and the physicochemical parameters determined in this study. This observation suggests that other physicochemical parameters predominantly act in the structure of eubacterial communities and/or that the complex network of metabolic interactions established by anaerobic microorganisms governs the organization of microbial communities. This last hypothesis could explain the elevated diversity of monimolimnion bacterial populations. It may be possible that microorganisms which exhibit anaerobic metabolism, which is less energetically efficient than oxygen-dependent metabolism, maintain a higher diversity of energetic pathways in anoxic environments. This network could lead to the retention of higher metabolic diversity, and as postulated by Humayoun et al. (18), ecological forces that act to structure aerobic microbial communities are fundamentally different from those that act to structure anaerobic microbial communities. A striking difference in microbial patterns between oxic and anoxic layers was reported above; however, strong intrazone variabilities in the eubacterial or archaeal phylotypic richness could also be observed. This is probably one of the main original observations of our study. Several successive sample points were collected for each physicochemically defined zone (e.g., six depths were sampled with 2 m of resolution for the chemocline), and this sampling strategy suggests that extrapolations about microbial community structure and diversity based on only one sampled point in a defined zone could yield false conclusions. This intrazone variability explains why the increase in the number of eubacterial TRFs (S_{eub}) was not statistically significant between the three water layers (high standard deviations). An example of this intrazone variability is illustrated by the COA analysis of eubacterial TRFs, which showed a striking relationship among TRFs from anoxic samples, except for the 75-m sample. This last sample presents a

greater similarity with the TRFs from the oxic layer, suggesting that an unknown factor affects the structure of the microbial community, and considering that the current state of inflow and outflow of water is negative in Lake Pavin, we could suggest a sublacustrine water input.

Distribution of SRB and methanogens according to depth.

The high SRB densities in the chemocline detected by the SRB385R probe account for 44% of the *Eubacteria*. This supports the suggestion of a biogenic origin for the H₂S found in the anoxic zone of Lake Pavin (2). The genera *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, and *Desulfovibrio*, targeted with specific probes (660R, 129F, and 687R, respectively), described only a small fraction of the SRB quantified in the chemocline, which means that other groups of SRB are involved in the sulfate reduction activity in this zone. These genera presented density peaks at the aerobic/anaerobic interface ($>10^5$ cells ml⁻¹), where their accumulated abundances were greater than the abundances of SRB determined with the probe SRB385R. This discrepancy can be explained by the work of Ramsing et al. (34), who revealed that members of the genera *Desulfobacter* and *Desulfomicrobium* as well as all species belonging to the genera *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacula*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, and *Desulfomonile* displayed at least one mismatch within the targeted region, resulting in an underestimation of SRB. The very clear-cut bipartite distribution of the genus *Desulfovibrio* has also been observed in the sediments of an oligotrophic lake (37). The great abundance of the genus *Desulfobulbus*, also noted in a stratified fjord (34) and in lake sediments (22), is in favor of a major role of this genus in sulfate reduction activity. The presence of these genera in the oxic zone is consistent with their physiological characteristics, notably their oxygen respiration ability (26). High sulfate reduction rates and high counts of sulfate-reducing bacteria have repeatedly been reported for oxic marine sediments and microbial mats (40). The presence of SRB cells in the oxic layer of Lake Pavin could suggest the existence of a specific physiological group adapted to live under oxygenic conditions, as epifluorescence microscopy observations revealed that some SRB cells appeared to be associated with detritic particles, which may provide anaerobic microhabitats that favor their activities. The targeted methanogen families, *Methanobacteriaceae* (hydrogenotrophic methanogens), *Methanomicrobiaceae* (hydrogenotrophic methanogens), and *Methanosarcinaceae* (acetoclastic methanogens), were present in all samples from the anoxic water column. The accumulated densities of these three groups peaked at 60 m (31.2% of the *Archaea* targeted with ARCH915). Among the three target groups of methanogens, the *Methanosarcinaceae* dominated the methane-rich depth interval below the chemocline. We noticed that methane concentrations were only correlated with the density of the *Methanosarcinaceae* ($r = 0.64$; $P < 0.05$), suggesting that this group plays an important role in the global methane budget of

the Lake Pavin anoxic zone. This group has been reported from other anoxic aquatic systems, e.g., Vetriani et al. (42) revealed that 10% of clones were placed within the *Methanobacteriaceae* and the *Methanosarcinaceae* for the anoxic region of the Black Sea water column. Ovreas et al. (31) showed that methanogenic bacteria in the water column of Lake Sælenvannet belonged to the *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales*; this is in agreement with our study, which shows that among the three families targeted, the *Methanosarcinales* and the *Methanomicrobiales* were detected within the entire anoxic water column. The simultaneous occurrence of SRB and MPA in the sulfate-limited monimolimnion of Lake Pavin (28) can be explained by alternative anaerobic processes to sulfate reduction, for example, dissimilatory Fe(III) reduction. This process could occur in the entire anoxic water column but probably occurs mainly in the chemocline because of the accumulation of particulate ferric iron (28), the elevated concentrations of Fe(II), and the high densities of SRB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to G. Mailhot (Photochemistry Laboratory of University of Clermont II) for help with DOC and ferrous iron data and to C. Faye (Biogema Institute, Clermont-Ferrand), who supplied capillary electrophoresis equipment for TRFLP analysis. We thank the Geochemistry Laboratory (University of Paris VII), particularly F. Prévot, D. Jézéquel, and N. Assayag, for providing the experimental setup for gas analysis and also for many helpful discussions on Lake Pavin geochemical processes. Many thanks are also addressed to K. Joblin (AgResearch, New Zealand) for his advice and to G. Demeure, J. C. Romagoux, and D. Sargos for their skilled technical assistance.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

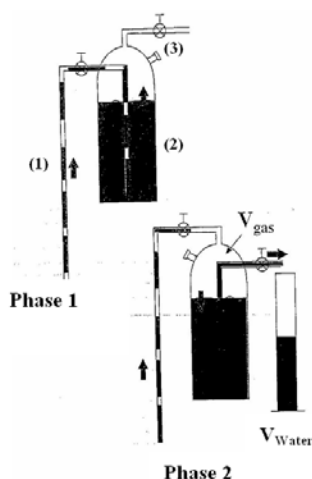


Fig. S1. Sampling procedure for gas analysis.

A tygon® tube (1) is immersed in the water at a chosen depth and water is brought up by means of a peristaltic pump. At the outlet of the pump, water and gases are collected in a Durand bottle (2). This bottle is equipped with two taps and a septum (3). Phase 1: Lake water is collected at the bottom of the bottle until the bottle is full.

Phase 2: Water is collected at the top of the bottle in order that only degassed water is discharged at the bottom. Gas remains trapped in the upper part of the bottle. The procedure is stopped after collection of 4 liters. Gas volume is measured and an aliquot of gas is sampled through the septum.

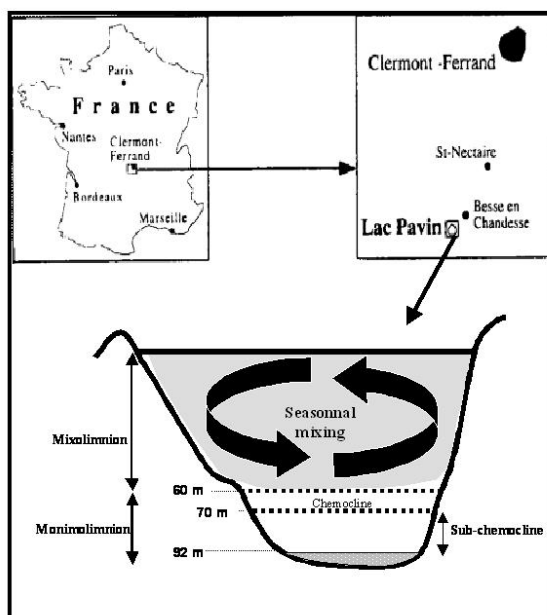


Fig.S 2. Localisation and schematic characteristics of lake Pavin. Water column can be divided in two zones: the mixolimnion which is affected by seasonnal mixing, and the anoxic monimilimnion composed by the chemocline (steep conductivity gradient) and the sub-chemocline.

REFERENCES

1. **Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
2. **Amblard, C., and F. Restituito.** 1983. Observations complémentaires en faveur de l'origine biogénique de la couche à hydrogène sulfuré d'un lac de moyenne montagne (Lac Pavin, France). *C. R. Acad. Sci.* **296**:1787-1790.
3. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. A. Sideman, and K. Struhl (ed.).** 1987. Current protocols in molecular biology, section 24. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
4. **Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Riel, and F. Thingstad.** 1983. Ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**:257-263.
5. **Béja, O., E. V. Koonin, L. Aravind, L. T. Taylor, H. Seitz, J. L. Stein, D. C. Bensen, R. A. Feldman, R. V. Swanson, and E. F. DeLong.** 2002. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:335-345.
6. **Bosshard, P. P., Y. Santini, D. Grüter, R. Stettler, and R. Bachofen.** 2000. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**:2138-2144.
7. **Boucher, D., L. Jardillier, and D. Debroas.** Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.*, in press.
8. **Braker, G., H. L. Ayala-Del-Río, A. H. Devol, A. Fesefeldt, and J. M. Tiedje.** 2001. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1893-1901.
9. **Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. R. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4801-4805.
10. **DeLong, E. F.** 1998. Everything in moderation: archaea as "non-extremophiles." *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:649-654.
11. **DeLong, E. F., L. L. King, R. Massana, H. Cittone, A. Murray, C. Schleper, and S. G. Wakeham.** 1998. Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1133-1138.
12. **DeLong, E. F., L. T. Taylor, T. L. Marsh, and C. M. Preston.** 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5554-5563.
13. **Devereux, R., D. K. Matthew, J. Winfrey, and D. A. Stahl.** 1992. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:601-609.

14. **Glöckner, F. O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. Trebesius, and K.-H. Schleifer.** 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:403-406.
15. **Hoefs, M. J. L., S. Schouten, J. W. De Leeuw, L. L. King, S. G. Wakeham, and J. S. Sinninghe Damsté.** 1997. Ether lipids of planktonic *Archaea* in marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3090-3095.
16. **Holfe, M. G., and I. Brettar.** 1995. Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the water column of the Central Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* **40**:868-874.
17. **Hollibaugh, J. T., P. S. Wong, N. Bano, S. K. Pak, E. M. Prager, and C. Orrego.** 2001. Stratification of microbial assemblages in Mono Lake, California, and response to a mixing event. *Hydrobiologia* **466**:45-60.
18. **Humayoun, S. B., N. Bano, and J. T. Hollibaugh.** 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030-1042.
19. **Jardillier, L., M. Basset, I. Domaizon, A. Belan, C. Amblard, M. Richardot, and D. Debroas.** 2004. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **35**:259-273.
20. **Kalver, J. G., and S. J. M. Pitts (ed.).** 1966. Photochemistry, p. 783. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
21. **Karner, M. B., E. F. Delong, and D. M. Karl.** 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**:507-510.
22. **Li, J., K. J. Purdy, S. Takii, and H. Hayashi.** 1999. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate-reducing activity in a freshwater lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:31-39.
23. **Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4513-4522.
24. **Madrid, V., G. Taylor, M. Scranton, and A. Chistoserdov.** 2001. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1663-1674.
25. **Margalef, R.** 1958. Information theory in ecology. *Gen. Syst.* **3**:36-71.
26. **Marshall, C., P. Frenzel, and H. Cypionka.** 1993. Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **159**:168-173.
27. **Massana, R., E. F. Delong, and C. Pedros-Alió.** 2000. A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1777-1787.
28. **Michard, G., D. J'ézéquel, F. Prévot, G. Sarazin, and E. Viollier.** Biogeochemical processes in Lake Pavin. Unpublished data.
29. **Moeseneder, M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G. Herndl.** 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton

communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3518-3525.

30. **Osborn, A. M., E. R. B. Moore, and K. N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**:39-50.
31. **Ovreas, L., L. Forney, F. L. Daae, and V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Sælvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3367-3373.
32. **Pederson, K., L. Hallbeck, J. Arlinger, A. Erlandson, and N. Jahromi.** 1997. Investigation of the potential for microbial contamination of deep aquifers during drilling using 16S rDNA gene sequencing and culturing methods. *J. Microbiol. Methods* **30**:179-192.
33. **Pernthaler, A., C. M. Preston, J. Pernthaler, E. F. DeLong, and R. Amann.** 2002. Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:661-667.
34. **Ramsing, N. B., H. Fossing, T. G. Ferdelman, F. Andersen, and B. Thamdrup.** 1996. Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1391-1404.
35. **Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1232-1240.
36. **Sass, A. M., H. Sass, M. J. L. Coolen, H. Cypionka, and J. Overmann.** 2001. Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania Basin, Mediterranean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5392-5402.
37. **Sass, H., H. Cypionka, and H. D. Babenzien.** 1997. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:245-255.
38. **Stahl, D. A., and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, United Kingdom.
39. **Suzuki, M., M. S. Rappé, and S. J. Giovannoni.** 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4522-4529.
40. **Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer, and N. B. Ramsing.** 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most probable number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1405-1415.
41. **Tuomi, P., T. Torsvik, M. Heldal, and G. Bratbak.** 1997. Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2181-2188.
42. **Vettriani, C., H. V. Tran, and L. J. Kerkhof.** 2003. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6481-6488.

43. **Viollier, E., P. Albéric, D. J'ézéquel, G. Michard, M. Pèpe, and G. Sarazin.** 1995. Geochemical study of a crater lake, the Pavin Lake, France. Trace element behaviour in the monimolimnion. *Chem. Geol.* **125**:61-72.
44. **Wintzingerode, P., U. B. Göbel, and E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.
-

Applied and Environmental Microbiology, November 2005, p. 7389-7400, Vol. 71, No. 11
0099-2240/05/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.71.11.7389-7400.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

ARTICLE 2

**Successions spatio-temporelles des communautés bactériennes en réponse à
l'anoxie dans l'hypolimnion d'un lac eutrophe et dimictique
(Lac d'Aydat, France)**

Lehours Anne-Catherine, Corinne Bardot, Pierre-François Pelisson,
Annie Guedon, Stéphane Pesce, Guy Demeure, Denis Sargos, et Gérard Fonty.

Aquatic Microbial Ecology

Résumé : En période de stratification thermique, l'hypolimnion des lacs eutrophes évolue en quelques jours de conditions oxydées à une anoxie complète. Cette transition constitue une perturbation majeure pour les communautés microbiennes de cette zone profonde, et peut potentiellement fournir un point référentiel (ou T0) à partir duquel il sera possible de suivre la mise en place progressive des communautés microbiennes anaérobies.

L'évolution de la structure, de la composition et de la diversité des communautés bactériennes consécutive à cette modification drastique a été analysée à trois profondeurs (10 m, 12 m, et 14 m) dans l'hypolimnion d'un lac eutrophe et dimictique : le Lac d'Aydat. Cette étude a débuté au printemps, deux semaines avant la mise en place de l'anoxie et des prélèvements hebdomadaires ont été réalisés jusqu'au brassage complet du lac en automne.

La composition des communautés microbiennes a été analysée par Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) et Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Les résultats fournis par ces deux méthodes complémentaires révèlent des modifications notables de la composition des communautés bactériennes entre les conditions oxydées et anoxiques. Durant la période anoxique, les communautés anaérobies présentent un processus graduel d'évolution particulièrement remarquable aux trois profondeurs échantillonnées. Une augmentation de la richesse phylotypique est également notée à 10 m et 12 m durant les premiers stades anoxiques alors que les communautés bactériennes de l'interface eau/sédiment (14 m) apparaissent suivre un schéma distinct. Les dendrogrammes établis à partir de matrice de similarité permettent de discriminer pour chaque profondeur des stades pionniers et matures dans les processus de succession. Bien que la composition des communautés bactériennes anaérobies révèle qu'une stratification est clairement établie au sein de cet hypolimnion, les communautés dominantes présentent une similarité supérieure à 55%, suggérant que les mêmes espèces dominent l'hypolimnion et que potentiellement les mêmes fonctions majoritaires sont accomplies à chaque profondeur.

SUCCESSIONAL CHANGES IN BACTERIAL COMMUNITY ASSEMBLAGES FOLLOWING ANOXIA IN THE HYPOLIMNION OF A EUTROPHIC LAKE

Anne-Catherine Lehours*, Corinne Bardot, Pierre-François Pelisson, Annie Guedon,
Stephane Pesce, Guy Demeure, Denis Sargos and Gérard Fonty.

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE), Université Blaise
Pascal-Clermont-Ferrand, UMR CNRS 6023, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière
Cedex.

ABSTRACT

Dynamics of bacterial assemblages following anoxia were characterized in the hypolimnion of a eutrophic lake (Lake Aydat). The sampling started in spring before the complete anoxia and was continued weekly until the complete mixing of the water column in autumn. Bacterial community patterns at the three sampled depths (10, 12 and 14 m) were investigated using temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analyses. Results revealed changes in the structure of the bacterial communities as conditions changes from oxic to anoxic. Once anoxia had been reached, anaerobic bacterial communities continued to change and exhibited gradual successional patterns at the three depths. During the anoxic period, bacterial communities at 10 and 12 m were discriminated in two groups corresponding to the steps 'until' and 'after' maximum stratification (august 19th). While the succession of bacterial community in the hypolimnion was dynamic and exhibited gradual patterns at the three depths, a "sensitivity gradient" to O₂ depletion was suggested: communities at 10 m appeared to be more affected by the shift in oxygen concentrations than those of the deeper water layers.

Key Words: Lake, bacterial community structure, succession, molecular fingerprint methods

*Corresponding author : : lehours@sb-roscoff.fr

Present address: Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France.
Phone: (33) 29829379

INTRODUCTION

In the water column of many eutrophic aquatic systems, three steps are observed during thermal stratification in regard to oxygen concentrations: (1) Increasing solar radiation in the spring leads to vertical stratification which reduces the rate of oxygen supply while aerobic respiration removes oxygen (2) In summer, the deepest water layers (hypolimnion) are anoxic (3) In autumn, decreasing solar radiation leads to cooling of surface water and to the deep penetration of oxygen. The overturn leads to the reoxygenation of the entire water column. Consequently, in the course of a few days, the habitat of microbial community in the hypolimnion shifts from oxygen supersaturation to anoxia (or the opposite) and new microbial niches are created, filled and destroyed in rapid succession (Finlay et al. 1997).

Lake Aydat in the French Massif Central supports an extensive seasonal anoxic zone (from 6 to 14 m, Michard et al. 2001) formed every year from May to October (Bettarel et al. 2004). This hypolimnion is populated with living and active communities of bacteria [bacterial abundance is in average $5 \cdot 10^6$ cells ml^{-1} and bacterial production ($114.2 \cdot 10^6$ bacteria $\text{liter}^{-1} \text{h}^{-1}$) is greater than that in overlying oxic water, Bettarel et al. 2003, 2004]. In this anoxic and aphotic water layer, fish, zooplankton and phytoplankton are excluded. Grazers (ciliates and flagellates) are rare and grazing rates are low (Bettarel et al. 2003, 2004) such as typically noted in anoxic waters (Weinbauer & Holfe 1998). Although, changes in bacterial community composition are influenced by carbon and nutrient sources [i.e. 'Bottom up' influences (e.g. Billen et al. 1990)] and to viral lyses (Weinbauer et Holfe 1998, Bettarel et al. 2004), this anoxic zone is an accurate and 'simplified' (with less complex trophic interactions) system to analyze the responses of bacterial populations to the shifting environmental conditions (e.g. anoxia).

The objective of the present work was to monitor the dynamics of the dominant bacterial community members in the hypolimnion of the eutrophic Lake Aydat during the three periods (1) (2) (3) previously described. In order to assess the changes in bacterial community, two cultivation-independent techniques were carried out on the 16S rRNA gene: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP) and Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) analyses.

MATERIAL AND METHODS

Site description and sample collection: Lake Aydat, located at $2^{\circ} 59' \text{E}$ and $45^{\circ} 40' \text{N}$ at 825 m altitude in the French Massif Central, is a small (surface area 60.3 ha; maximum depth 14.5 m) dimictic lake. It originates from a dam formed by a basaltic flow approximately 7500 years ago.

<i>Primer</i>	<i>Sequence 5'→3'</i>	Reference
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Suzuki and Giovannoni 1996
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT	Suzuki and Giovannoni 1996
27f-GC clamp	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGCGGGGGGCACGGGGGGAG	Weisburg et al. 1991
	AGTTTGATCCTGGCTCAG	
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer et al. 1993

Table 1: Primers for the PCR amplification of eubacterial 16S rDNA.

Depth profiles of water temperature (± 0.2 °C) and oxygen concentration (± 0.03 mg l⁻¹) were determined *in situ* using a portable multisensor probe (WTW®) and values were interpolated through the water column by using Surfer 7.0 (Golden software Inc, Colorado). From May to November 2004, 28 weekly sampling sets were performed at 10 m, 12 m and 14 m (Fig. 1A and 1B) on a vertical at the deepest place in the lake using an 8 l horizontal Van Dorn bottle. The physicochemical composition of the hypolimnion has been reported in previous studies (e.g. Ogier 1999).

DNA extraction and PCR amplification: 400 ml water samples were filtered onto 0.2 µm pore-size polycarbonate filters (47 mm diameter, GTTP, Millipore). DNA extractions were performed as previously described (Jardillier et al. 2004). For TRFLP analysis, amplification of the bacterial 16S rDNA genes was performed using the combination of the bacterial 27f primer -5'-labeled with FAM® and the universal primer 1492r (Table 1). For TTGE analysis, the primer 27f modified with a GC-rich sequence at the 5' end was used in combination with the universal primer 518r (Table 1). Reaction mixture contained 5 µl 10X buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Eurobio), 1.25 U of Taq polymerase (Bioline, Abcys), 10 pmoles of each oligonucleotide primer, and 50-100 ng of template DNA for a final volume of 50 µl. Amplifications were performed with a model PTC-200 cycler (MJ research) using the following program: a 5-min hot start at 95 °C, followed by 30 cycles consisting of denaturation (1 min at 95°C for T-RFLP; 30 s at 94°C for TTGE), annealing (1 min at 55°C for T-RFLP; 30 s for TTGE), and extension (1 min at 72°C for T-RFLP; 30 s for TTGE) and a final extension (10 min at 72°C for T-RFLP; 7 min for TTGE). Amplified DNA was checked by electrophoresis in 1.0% agarose in 1x TBE buffer.

T-RFLP procedure: 25 µl of enzymatic digestion mixture containing 100 ng of labeled DNA and 20 U of MspI (Sigma) in the manufacturer's recommended reaction buffer were incubated for 12 h at 37°C (Lehours et al. 2005). Restriction digests were inactivated by heating to 65°C for 10 min and then purified and desalted using Micropure EZ-Microcon 30 columns (Millipore) to prevent ion interference with the uptake of DNA using electrokinetic injection (Moeseneder et al. 1999). The volume of all samples was checked after EZ column purification in order to reduce bias resulting from differences in column eluent volume, which could lead to large differences in the mass loaded into the sequencer (and consequently to large differences observed in detectable peaks, Lehours et al. 2005). Fluorescently-labeled terminal restriction fragments (TRFs) were analyzed on an ABI 3700 automated sequence analyzer (Applied Biosystems) in GeneScan mode. 2.3 µl of the restriction enzyme digest were mixed with 0.5 µl of GeneScan-1000 ROX size standard (Applied Biosystems) and 3.2 µl of deionized formamide, and then denaturated at 94°C

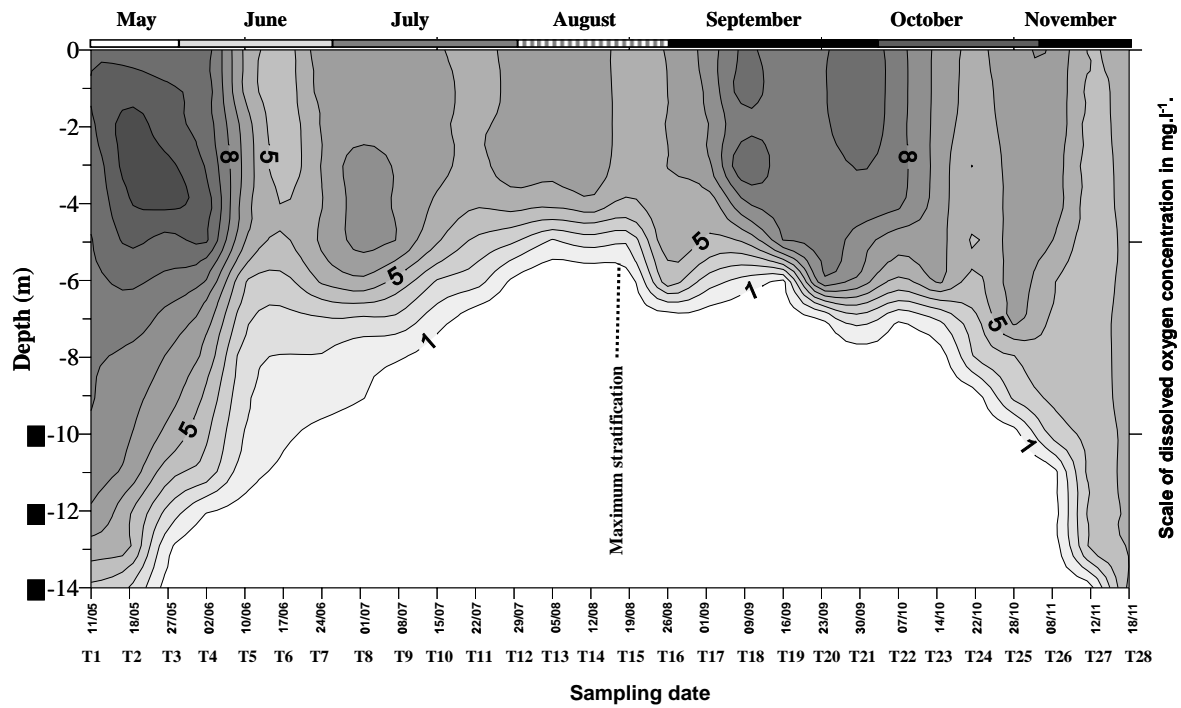
for 3 min. Injections were performed electrokinetically at 7.7 KV for 40 s. Three replicate TRF profiles were obtained from the digested DNA by loading three aliquots of digested DNA onto three different capillaries. This replication level was performed to measure the degree of variation in TRF profiles arising solely as a result of experimental error during electrophoresis of DNA digest samples. To avoid detection of primers and uncertainties in size determination, TRFs smaller than 50 bp and larger than 800 bp were excluded. TRFs were analyzed by aligning fragments to the size standard by using GeneScan analytical software (Applied Biosystems). Replicate profiles of each sample were compared to identify the reproducible fragments (peaks that appeared in at least two replicate profiles of a sample). Only reproducible TRFs were considered in the numerical analysis. TRFs that differed by less than 1 bp were considered identical (Dunbar et al. 2001) and were clustered. A program in Visual Basic for Excel was developed to automate these procedures. TRF signal (representing height or area) was assumed to be proportional to the relative abundance of the species. TRFs were expressed as relative abundances of the total signal detected in the TRFLP profile. TRFs below a threshold of 0.1% of the total profile signal were deleted and relative abundances of remaining TRFs were recalculated (Blackwood et al. 2007).

TTGE procedure: Three hundred nanograms of each amplified product were electrophoresed along a 8% (wt/vol) polyacrylamide gel (7M urea, 1.25X TAE, 0.06% Temed and 0.06% ammonium persulfate) using the DCode Universal Mutation Detection System (BioRad). Runs were performed in 1.25x TAE at 68 V for 17 h with a temperature range of 66°C to 69.6°C and a ramp rate of 0.2°C per hour. The reference patterns consisted of a mixture of amplified 16S rDNA V1 to V3 fragments of three bacterial strains (*Aeromonas caviae*, *Kurtzia zopfii*, *Escherichia coli*). Following electrophoresis, gels were stained in a Gel Star nucleic acid gel stain bath (BMA) and the banding patterns were examined under ultraviolet light. The gels were digitally photographed (Versa DocTM Imaging System (BioRad)), converted to TIFF file, normalized using reference patterns and analyzed with the GelCompare 4.6 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Analyses of TRFLP and TTGE patterns

From the binary data, dissimilarities among the TRFLP and TTGE patterns were estimated using Dice's coefficient ($D = 1 - [(2N_{ab}) / (2N_{ab} + N_a + N_b)]$), where N_{ab} is the number of bands or TRFs that are present in sample 'a' and 'b'; N_a is the number of bands or TRFs present in 'a' and N_b is the number of bands or TRFs present in 'b' (Sneath and Sokal 1973). For TRFLP pattern, dendrograms were generated from the above matrix using the Ward's method which uses an analysis of variance approach to evaluate the distances between clusters (Ward 1963). A distance

A



B

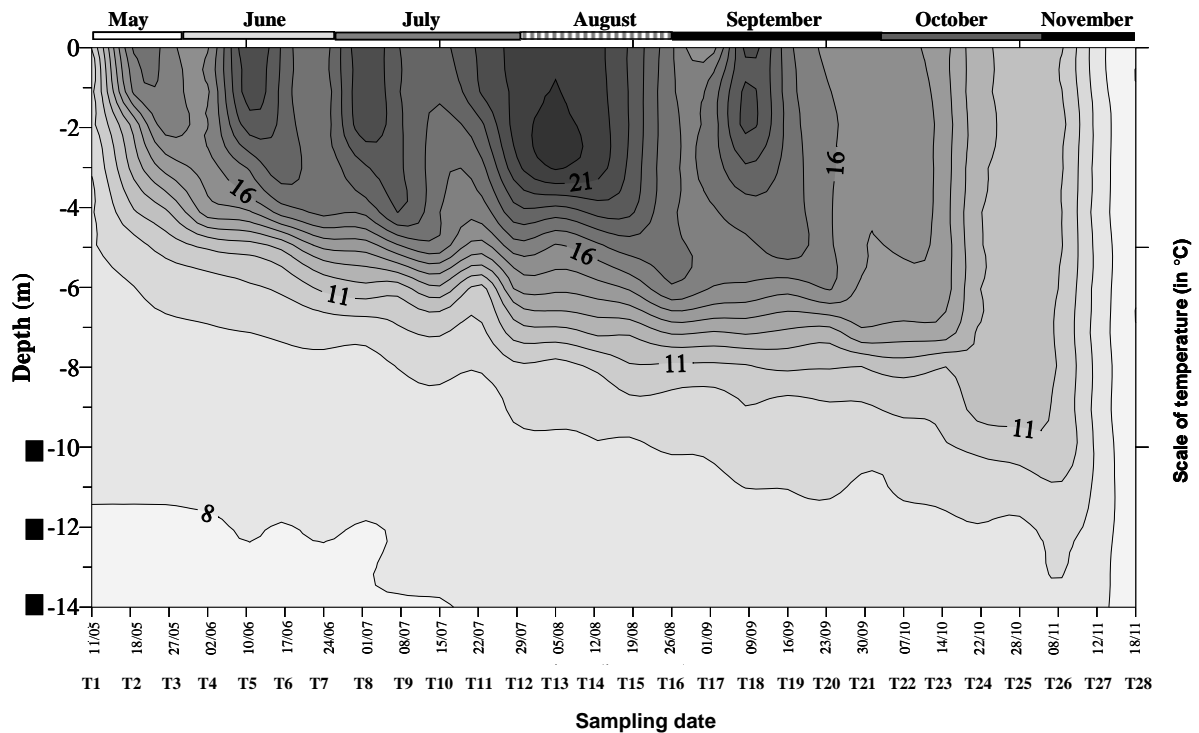


Figure 1: (A) Evolution of dissolved oxygen concentrations (mg.l⁻¹) and (B) temperature (°C) in the water column of Lake Aydat during the 28 weekly sampling dates from May 11th 2004 (T1) to November 18th 2004 (T28). The depths sampled are indicated (■).

of 1.1 was used to separate clusters in hierarchical classification performed from TRFLP data. Analysis of similarity (ANOSIM, Clarke 1993) was used to test the hypothesis that communities within clusters were more similar to each other than to communities in others clusters. Correlations between TRFLP and TTGE dissimilarity matrices were calculated using Mantel test (Mantel 1967) with 10000 permutations and were performed with XLSTAT Version 6.01 package (Addinsoft). Similarity between TRFLP patterns was calculated using correspondence analysis (COA) computed using the R software ADE4 package for COA analysis (<http://cran.r-project.org/>). Correspondence analyses for TTGE data were performed with XLSTAT Version 6.01 package (Addinsoft). Canonical correspondence analyses (Legendre et Legendre 1998) were used to determine the extent to which dissolved oxygen concentrations explained patterns of similarity within bacterial communities and were performed with PAST 1.81 (Hammer et al. 2001, http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). The Smith and Wilson evenness index (Smith and Wilson 1996) was calculated as previously described from TRFLP data using the Ecological Evenness Calculator software (<http://www.nateko.lu.se/personal/benjamin.smith/software>). The number of distinct TRFs in a sample was expressed as Richness (S).

RESULTS

Spatiotemporal profiles of dissolved oxygen and temperature: The changes in water temperature and oxygen contents were typical of a temperate lake, with stratification starting in spring (Fig. 1A and 1B). Anoxia started to occur in the deeper water from May (May 27th at 14 m, T3, Fig. 1A) and progressively ascended the water column until it reached a depth of 6 m at the maximum of stratification (August 19th, T15, Fig. 1A). By the middle of October, a deep penetration of oxygen was observed (Fig. 1A). Following the overturn (November 18th, T28, Fig. 1A and 1B), oxygen occurred in the entire water column.

During the sampling effort, the different periods observed at the three sampled depths with regards to dissolved oxygen concentrations (Fig. 2A to 4A) were the following: oxic, hypoxic, anoxic and re-oxidized periods (Table 2). Considering the temperature and oxygen diagrams (Fig. 1A and 1B), two stages were distinguished during anoxia: until maximum stratification and after maximum stratification (Table 2).

Dynamics of bacterioplankton communities: Hierarchical cluster analyses were performed at each depth from TRFLP binary data and results are presented in Fig. 2C to 4C. At 10 m, TRFLP data were clustered in five groups considering a cut off value of 1.1: cluster C1 grouped bacterial communities at dates T1 and T2 for which the highest concentrations of dissolved oxygen were

State	SAMPLING PERIOD				
	« Before » Anoxia		Anoxia (<0.75 mg.l ⁻¹)		« After » anoxia
	Aerobic period	Hypoxic period (<3mg.l ⁻¹)	Until maximum stratification	After maximum stratification	Aerobic period
10 m	T1→T4	T5→T7	T8→T15	T16→T25	T26→T28
12 m	T1→T2	T3→T5	T6→T15	T16→T26	T27→T28
14 m	T1	T2	T3→T17	T18→T27	T28

Table 2: Steps observed at the three sampled depths in regard to oxygen concentrations during the sampling effort. For the dates corresponding to T1 to T28, refer Figure 1.

Comparison	10 m		12 m		14 m	
	R-statistic	P value	R-statistic	P value	R-statistic	P value
C1 vs C2	1	0.04	0.53	0.0001	0.49	0.0001
C1 vs C3	1	0.02	0.92	0.0001	0.47	0.0001
C1 vs C4	1	0.02	-	-	-	-
C1 vs C5	1	0.05	-	-	-	-
C2 vs C3	0.83	0.0004	0.80	0.0001	0.47	0.0002
C2 vs C4	0.93	0.0013	-	-	-	-
C2 vs C5	0.99	0.008	-	-	-	-
C3 vs C4	0.80	0.0001	-	-	-	-
C3 vs C5	1	0.0008	-	-	-	-
C4 vs C5	0.69	0.0005	-	-	-	-

Table 3: ANOSIM statistics for comparisons of communities between clusters (for a cut off value of 1.1) using TRFLP similarity values derived from binary data (presence/absence).

measured (up to 7 mg.ml⁻¹, Fig.2A), communities of the aerobic and hypoxic period clustered together (C2, Fig. 2C), communities of the anoxic period were clustered into C3 and C4 according to the two stages previously defined (“until” and “after” maximum stratification, Table 2) and finally the cluster C5 grouped the bacterial communities of the re-oxidized period. At 12 m and 14 m, 3 clusters were discriminated (Fig. 3C and 4C). At 12 m, cluster C1 grouped together communities of the aerobic and hypoxic period (T1-T5) with those of the re-oxidized period (T27-T28), clusters C2 and C3 grouped the communities of the anoxic period “until” and “after” maximum stratification respectively (Fig. 3C). Note that more dissimilarity was observed at 10 and 12 m between bacterial communities of the two anoxic stages (“until” and “after” maximum stratification) than between communities of the oxic and anoxic periods. At 14 m, a more distinct pattern was observed compared to 10 and 12 m: cluster C1 grouped communities of the aerobic and hypoxic periods (T1-T2), of the beginning of anoxia (T3 to T9), with those detected at the end of anoxia (T26-T27) and those of the re-oxidized conditions (T28). These grouping in cluster analyses from TRFLP data were confirmed with ANOSIM which showed that communities in each cluster were more similar to each other than to those of the other clusters (Table 3).

Similarities between TTGE patterns are illustrated by correspondence analyses (Fig. 5). At 10 m, groupings were very similar to those obtained by TRFLP data with G1 and G4 which grouped communities of the aerobic period before and after anoxia respectively. At 12 m, more similarity was noted between communities at T28 and communities of the aerobic and hypoxic periods (T1 to T5) such as observed from TRFLP data (Fig. 3C). At 14 m, the group G1 which clustered communities from T1 to T11, but communities at T27 and T28 were not grouped with G1 such as noted from TRFLP data (Fig.4C). Despite some differences between TRFLP and TTGE analyses, which were more pronounced at 14 m, significant correlations between TRFLP and TTGE dissimilarity matrices were found at the three sampled depths ($R= 0.638$ at 10 m, $R= 0.683$ at 12 m and $R=0.473$ at 14 m, $p=0.0001$ $\alpha<0.05$).

In the COA analysis performed from TRFLP patterns, bacterial communities at 12 and 14 m shifted away from those at 10 m, but as the anoxia progressed, similarities between communities of the three depths increased (Fig. 6). More similarities were observed between the later sampling dates at 10 m (T24 to T28) and the early and intermediate sampling dates at 14 m and 12 m (Fig. 6). Such as observed from cluster analyses (Fig. 3C et 4C), more similarities were noted between the communities of the oxic period and those of the re-oxidized conditions at 12 and 14 m.

Canonical correspondence analysis (CCA) performed from relative abundance TRFs data revealed that more than 30% of the variability of the global bacterial community at 10, 12 and 14

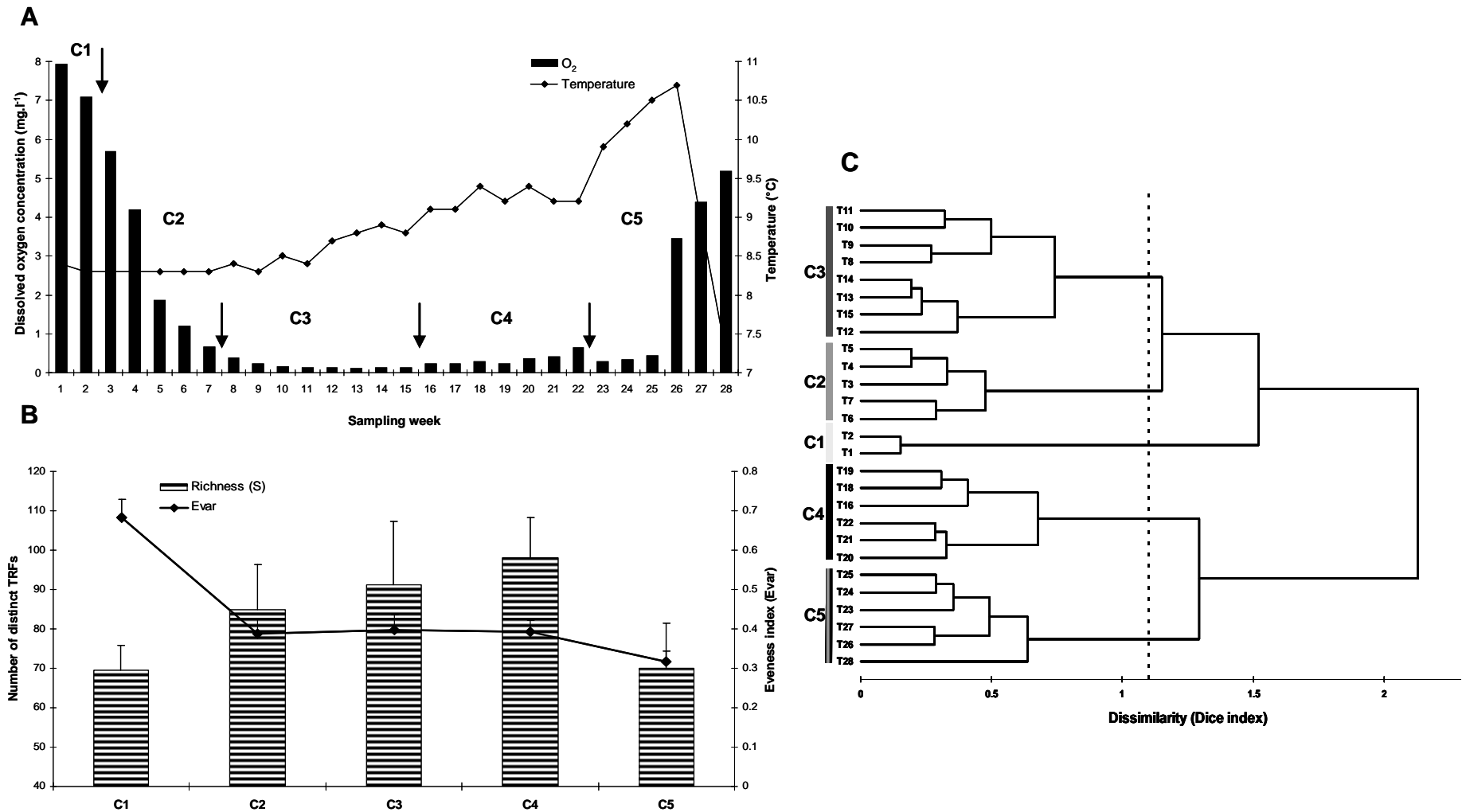


Figure 2: (A) Evolution of dissolved oxygen concentrations (mg.l⁻¹) and temperature (°C) at 10 m. C1 to C5 represent clusters defined by hierarchical analysis performed from community TRFLP fingerprint at 10 m (C). (B) Evolution of the average richness (S) and Smith and Wilson evenness index (E_{var}) for clusters defined at 10 m.

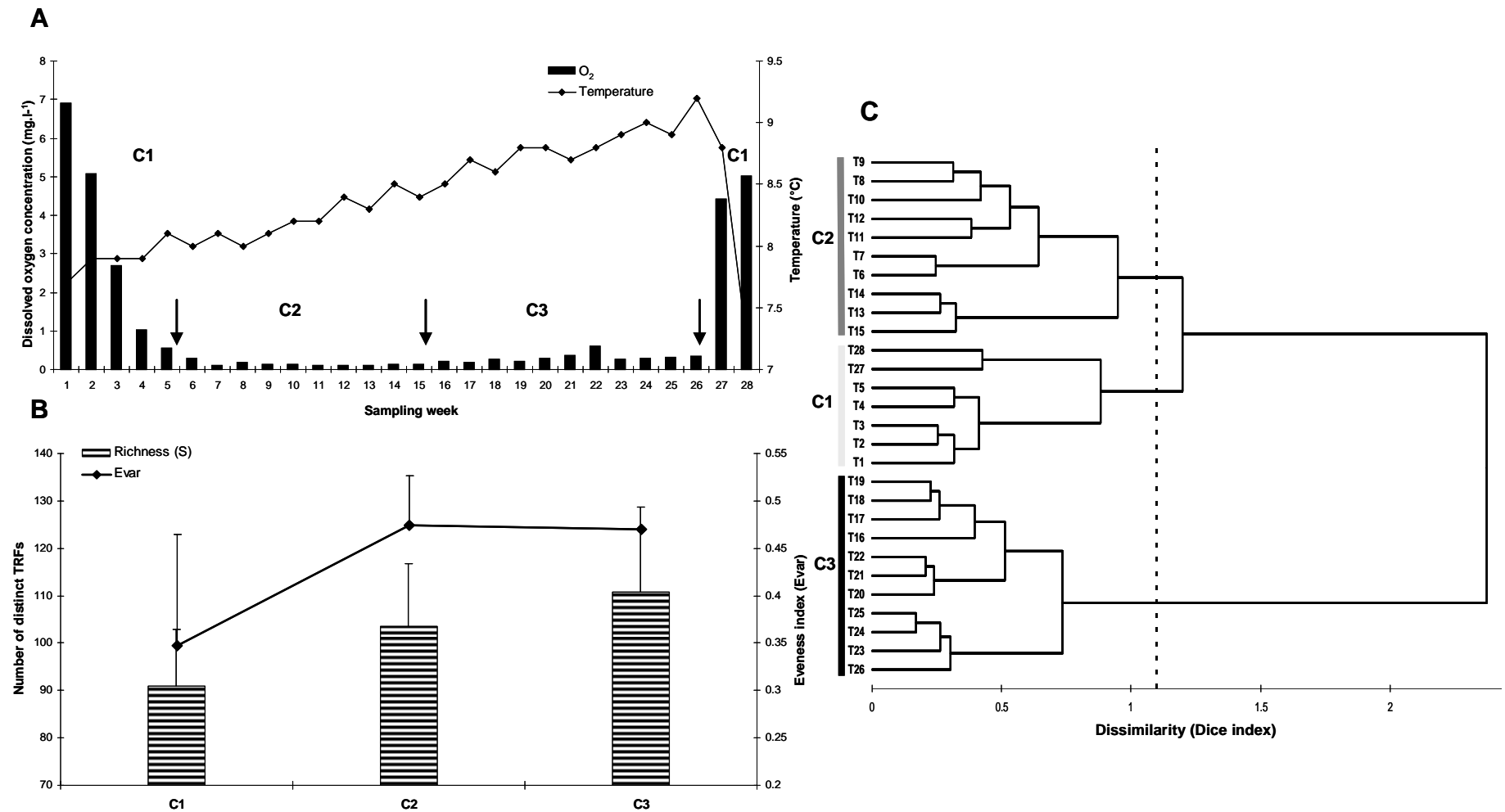


Figure 3: (A) Evolution of dissolved oxygen concentrations (mg.l-1) and temperature (°C) at 12 m depth. C1 to C5 represent clusters defined by hierarchical analysis performed from community TRFLP fingerprint at 12 m (C). (B) Evolution of the average richness (S) and Smith and Wilson evenness index (E_{var}) for clusters defined at 12 m.

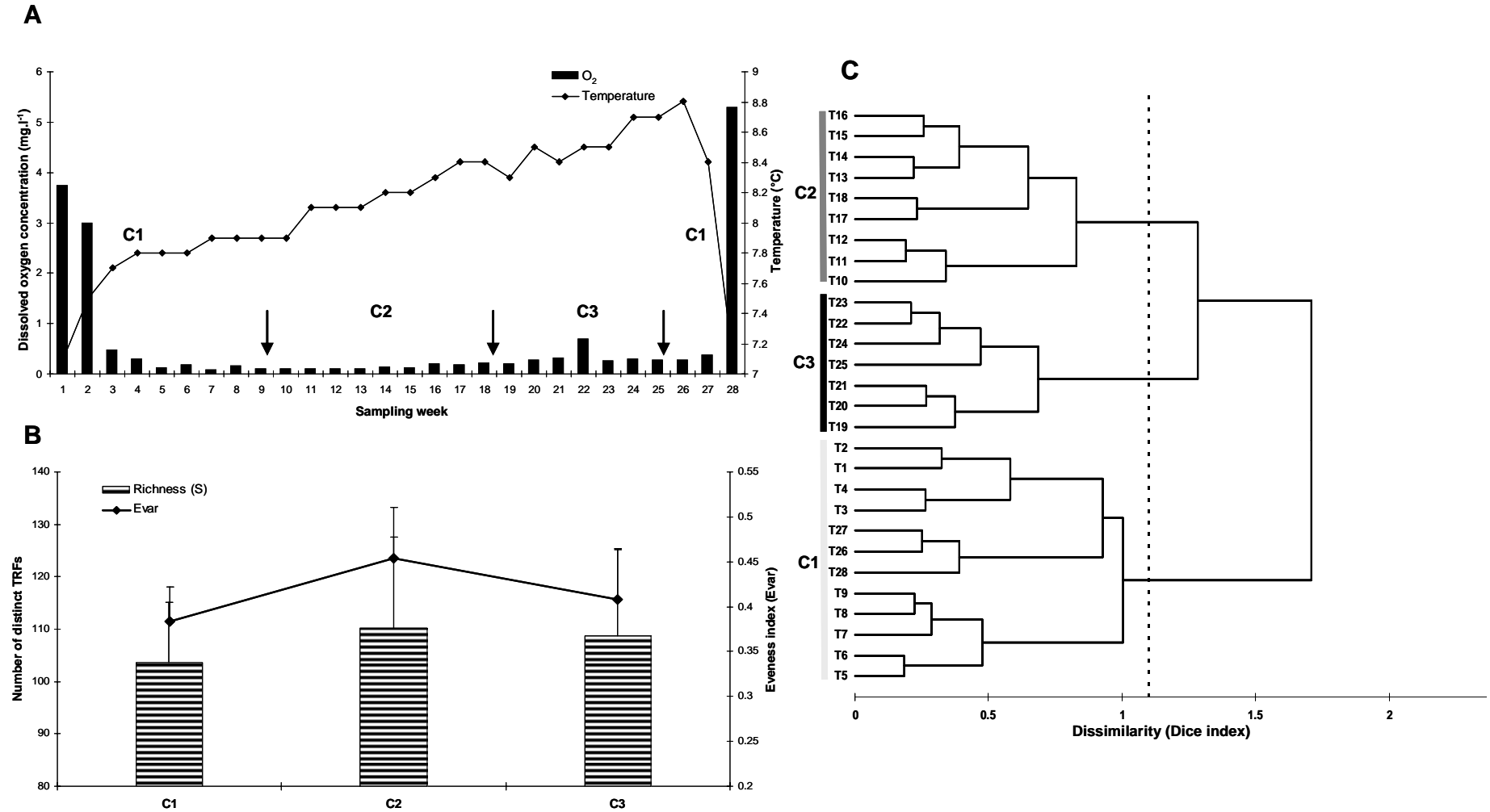


Figure 4: (A) Evolution of dissolved oxygen concentrations (mg.l-1) and temperature (°C) at 14 m depth. C1 to C5 represent clusters defined by hierarchical analysis performed from community TRFLP fingerprint at 14 m (C). (B) Evolution of the average richness (S) and Smith and Wilson evenness index (E_{var}) for clusters defined at 14 m.

m was described by dissolved oxygen and temperature variables (data not shown). At each depth, the distribution of the aerobic, hypoxic and anoxic (until and after maximum stratification) communities was a response to the dissolved oxygen gradient with communities of oxic and hypoxic period discriminated on the axis 1 from communities of the anoxic period (Fig. 7). Oxygen concentrations explained 41%, 22% and 14% of the community changes at 10 m, 12 and 14 m respectively (Fig. 7). At 10 m, communities at T23 to T27 were also clearly discriminated on the axis 2 by temperature variable and directly corresponded to an increase in temperature (from 9.2 at T23 to 10.7 °C at T27, Fig. 2A).

Diversity of bacterial communities: The average values of the Smith and Wilson evenness index (E_{var} , Fig. 2B to 4B) calculated at each depth were not significantly different between clusters defined from TRFLP analyses (Fig. 2C to 4C). We can nevertheless observe, at 12 and 14 m, that the maximum values of E_{var} were noted for clusters C2 which grouped anoxic communities until maximum stratification (0.47 ± 0.05 at 12 m, 0.45 ± 0.05 at 14 m). Richness (S) was calculated from the number of different TRFs in each sample and was significantly correlated to E_{var} at the three depths ($R=0.736$, $R=0.582$, $R=0.837$ $p<0.0001$ at 10, 12 and 14 m respectively). For the three depths the lowest S values were noted for communities of the aerobic period [C1 (70 ± 5) and C5 (70 ± 11) at 10m, C1 (90 ± 12) at 12 m, C1 (103 ± 11) at 14 m)].

DISCUSSION

Several studies have gathered routine profiles of the transition between oxic and anoxic bacterial communities along a persistent vertical oxygen gradient and in a permanent anoxic layer (e.g. Vetriani et al. 2003, Lüdemann et al. 2000, Lehours et al. 2005). However, to our knowledge, few studies have investigated the influence of anoxia on bacterial structure and dynamic in the hypolimnion of a temporal stratified aquatic system. The dataset of this study included 96 samples which were analyzed independently with two profiling procedures (TRFLP and TTGE). Although these fingerprint techniques do not provide information on the functioning of bacterial communities, they are well suited to the investigation of changes in community structure over space and time. The sampling effort which was performed weekly at the three depths in the hypolimnion (10, 12 and 14 m) allowed to investigate changes in bacterial structure according with a time-lag in both the establishment of anoxic and of re-oxidized conditions (Fig. 1A, Table 2).

Methodological aspects and constraints

The application of molecular methods for the description of the complexity of natural prokaryotic communities is hampered by methodological constraints (more than 90% of bacteria

are not yet cultivated, Pace 1997). Whereas detailed phylogenetic information on the dominant members of microbial communities can be generated by sequencing cloned PCR products, the effort and cost involved hinders the analysis of multiple samples (Osborn et al. 2000). Rapid profiling procedures have then gained in popularity when addressing questions related to the diversity, structural composition and dynamic of microbial communities (e.g. Muyzer et al. 1993, Lee et al. 1996). These methods present all the limitations common to molecular tools, including extraction of nucleic acids, biases and artifacts associated with enzymatic amplification of the nucleic acids, *etc.*, which have been well described in numerous publications (e. g. Head et al. 1997). We also assume that both TTGE and TRFLP present their own pitfalls which can bias the estimation of bacterial diversity. For example, it should be underlined that the number of TRFs observed can be biased by the formation of pseudo-TRFs (Egert and Friedrich 2003) and by fragments of the same size originating from different taxa (Blackwood et al. 2007). The co-migrating events that occur in TTGE analysis may also lead to an underestimation of bacterial diversity (Muyzer et al. 1998). Another major pitfall is that molecular profiling methods (such as TTGE and TRFLP) normally characterize only « dominant » organisms (e.g. >1% of the community) due to their detection limits (Blackwood et al. 2007). Hence rare species, which often make up the vast majority of the diversity in microbial communities, can never be detected (Pedros Alió 2006).

Considering that each enzyme presents a different level of success (fidelity) in detecting sequence variants from communities with varying richness, we selected MspI for the restriction digests which has been shown to have the better resolving capacities (Engelbreton and Moyer 2003). A previous study also revealed that consistent richness and diversity dynamics were observed in an anoxic layer with three independent restriction digests (with MspI, HhaI and RsaI), but that MspI was the top performer in terms of the ability to identify the greatest number of TRFs (Lehours et al. 2005). The inclusion of an internal standard size in each sample in T-RFLP should provide the necessary degree of reproducibility (Osborn et al. 2000) and thus enable integrative comparison of all samples (represented by a COA, Fig. 6). The semi-quantitative TRFLP analysis procedure again contains several sources of potential bias, but does enable a more objective comparison of fingerprint patterns than TTGE because of the automated quantification of relative abundance of individual TRFs (Lüdemann et al. 2000). To give more relevance to this study, the bacterial communities were also investigated by a second profiling procedure (TTGE). Both methods led to similar observations about the changes in bacterial community such as revealed by the significant correlations between TTGE and TRFLP similarity matrices. TRFLP and TTGE clustering (TTGE clusters not shown) were consistent despite the fact that different primers

(Table 1) were used which targeted different (but likely overlapping) portions of the 16S rRNA gene. These results suggest that shifts and patterns observed were mainly the result of changes in bacterial community structure in the hypolimnion of Lake Aydat and not of artifacts associated with the method used.

Evenness and Richness of bacterial communities: Following the conclusions of Blackwood and coworkers (2007), the Smith and Wilson evenness index (E_{var}) was used in this study as a measure of diversity. At 12 and 14 m, E_{var} tended to increase between aerobic and anaerobic conditions suggesting that the diversity of anaerobic communities is at least comparable even highest to that of aerobic communities and thus changes in bacterial community composition were not the result of a strong decrease in bacterial evenness. While the number of TRFs (richness, S) has not been previously found to accurately predict the number of taxa in microbial community (Loisel et al. 2006, Blackwood et al. 2007), S values are of interest because significant correlations were noted between S and E_{var} at the three depths. An increase of S with depth (85 ± 14 , 103 ± 15 , 106 ± 17 in average at 10 m, 12 m and 14 m respectively) was noted suggesting that bacterial richness increased with depth in this freshwater anoxic zone such as previously observed (Lehours et al. 2005).

Temporal changes in community structure:

Changing environmental factors, localized gradients, stochastic processes, spatial separation and others factors could all result in random or loosely coordinated populations (Zhou et al. 2002, Martiny et al. 2003). However, during the thermal stratification of Lake Aydat, gradual successional patterns were observed at the three sampled depths (Fig. 2C, 3C, 4C and 6).

Shift from oxic to anoxic conditions

At 10 and 12 m, the initial consumption of oxygen by aerobic bacteria led to a separation of aerobic from anaerobic processes and as a result, to a temporal shift in the microbial community composition such as previously observed (Risatti et al. 1994, Brune et al. 2000). Changes in both TTGE and TRFLP community patterns directly corresponded to the depletion of oxygen (Fig. 2C and 3C). Although not a final proof, this close correlation provides strong evidence that the presence or absence of oxygen was a major factor which determined the changes in the bacterial community structure and was also noted by Lüdemann et al. (2000) along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. The impact of oxygen depletion on bacterial community composition was also confirmed by canonical correspondence analyses (CCA) which showed that oxic and anoxic communities were clearly discriminated by oxygen at 10 and 12 m and to a lesser extends at 14 m (Fig. 7).

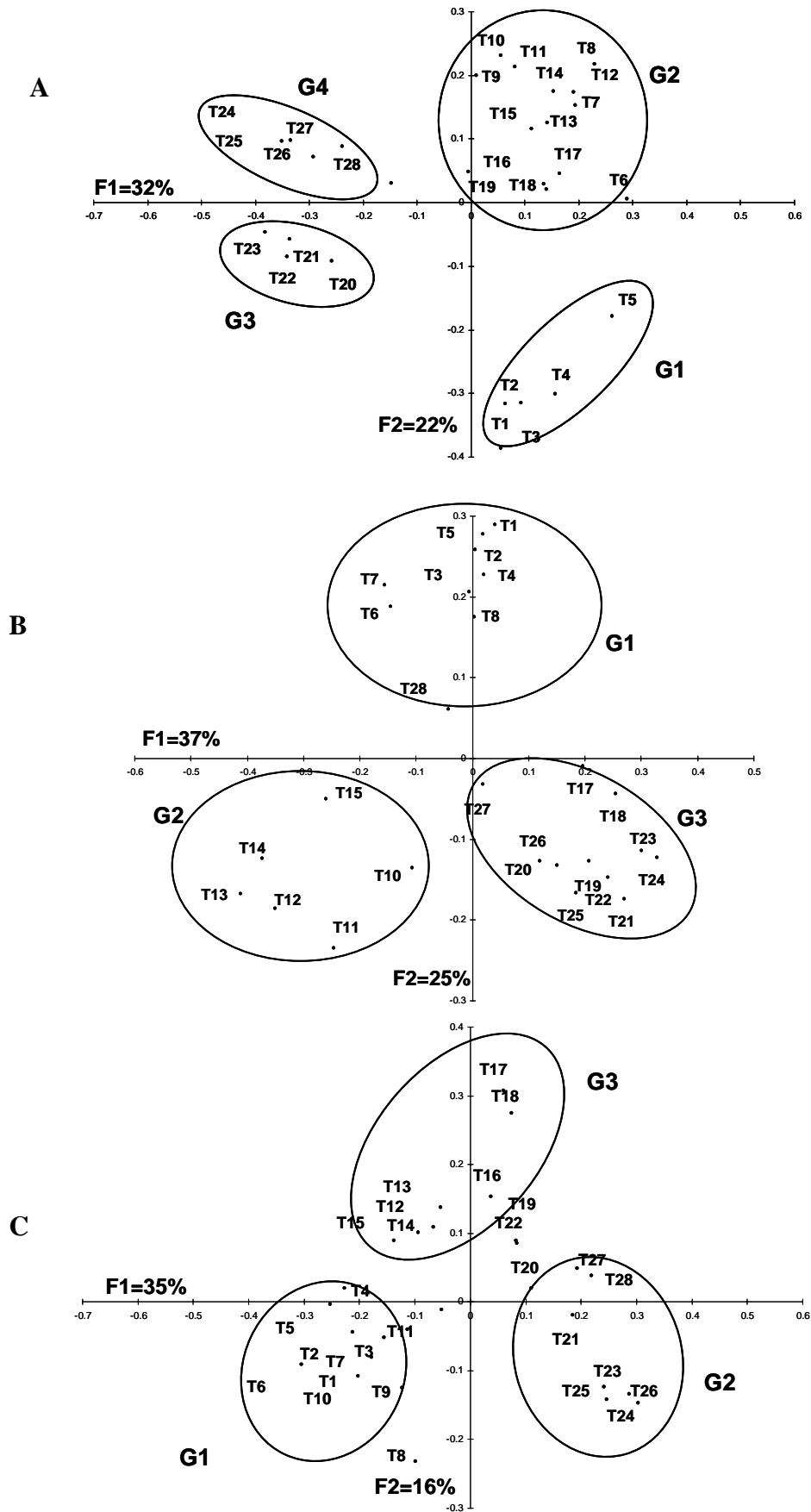


Figure 5: Correspondence analyses performed with TTGE similarity values derived from binary data at (A) 10 m, (B) 12 m and (C) 14 m.

Anoxic period

During anoxia, succession of bacterial communities from both TRFLP and TTGE patterns continued and followed an orderly progression (Fig. 2C to 4C and 5). At 10 and 12 m depths, bacterial community during the anoxic period became increasingly different from the oxic community over the following 15 weeks of sampling (Fig. 2C and 3C) which corresponded to the date of maximum stratification (T15, Fig. 1). Crump et al. (2007) has also noted that the time available for the bacterial community composition to change depends on the amount of time that the water is anoxic. Bacterial communities within clusters ‘until’ (C3 at 10 m and C2 at 12 m) and ‘after’ (C4 at 10 m and C3 at 12 m) maximum stratification might be defined as “early-like” and “mature-like” anaerobic communities (Fig. 2C and 3C). These grouping probably revealed the ability of organisms to respond to the disturbance (e.g. opportunists and maintenance- type organisms, Sigler & Zeyer 2004). However, we have to consider that many environmental factors may also contribute to these changes, for example, Crump et al. (2007) observed that a dramatic shift in bacterioplankton community composition in a stratified estuary occurred when sulfide concentrations were very high.

At 14 m, a special scheme was observed: after onset of anoxia community succession led to a mixture of aerobic and anaerobic populations (Cluster C1, Fig. 4C) suggesting that some populations were able to live in both conditions (facultative anaerobic bacteria) or were maintained in anoxic micro niches during the oxidized period. The depth 14 m (just above the sediment) frequently presents low oxygen concentrations, such as observed at T1 to T2 (O_2 concentrations $< 4 \text{ mg.l}^{-1}$, Fig. 4A), raising the possibility that more communities were pre-adapted to anoxia and may explain why aerobic communities clustered with communities of the first set of anoxia (T1 to T9). Similarity between bacterial communities at T25 to T28 (Fig. 4C and 6) and those at T1 to T5 also suggests that communities at 14 m maintained their pioneer characteristics. This is consistent with Finlay et al. (1997) who suggested that the microbial species that appeared during the period of stratification return to the sediment, where they presumably remain viable. Therefore, in Lake Aydat, the sediment constitutes a reservoir of anaerobic bacteria which could quickly colonize the anoxic niches at 14 m once the environmental conditions become favorable.

Renewal of oxygen:

From the middle of October, oxygen progressively came into in the hypolimnion (Fig.1A) and a new shift in bacterial community at 10 m was observed (clusters C4 and G4, Fig.2.C and 5A). At 12 m and 14 m, communities of the re-oxidized conditions were similar to those of the aerobic

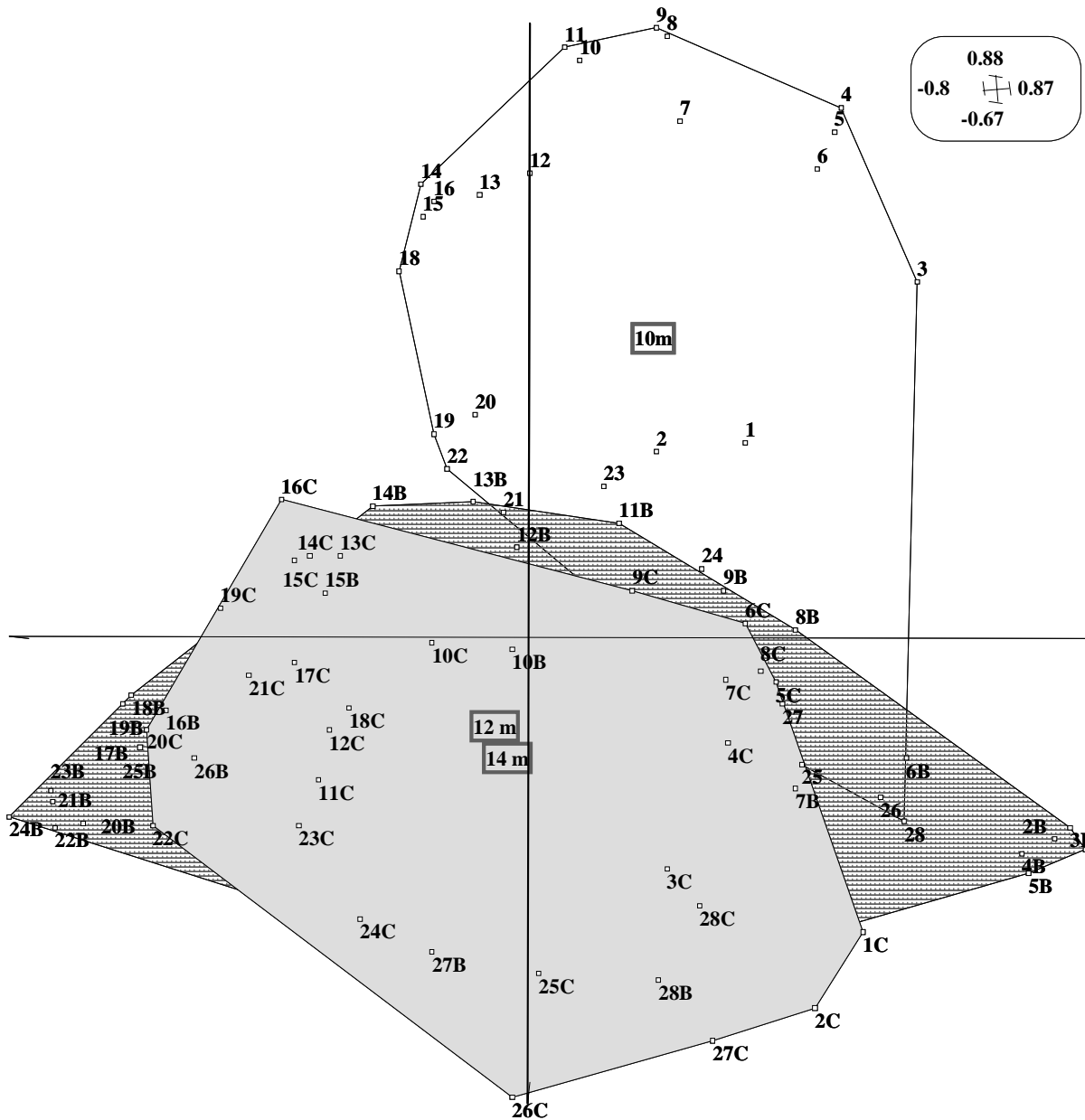
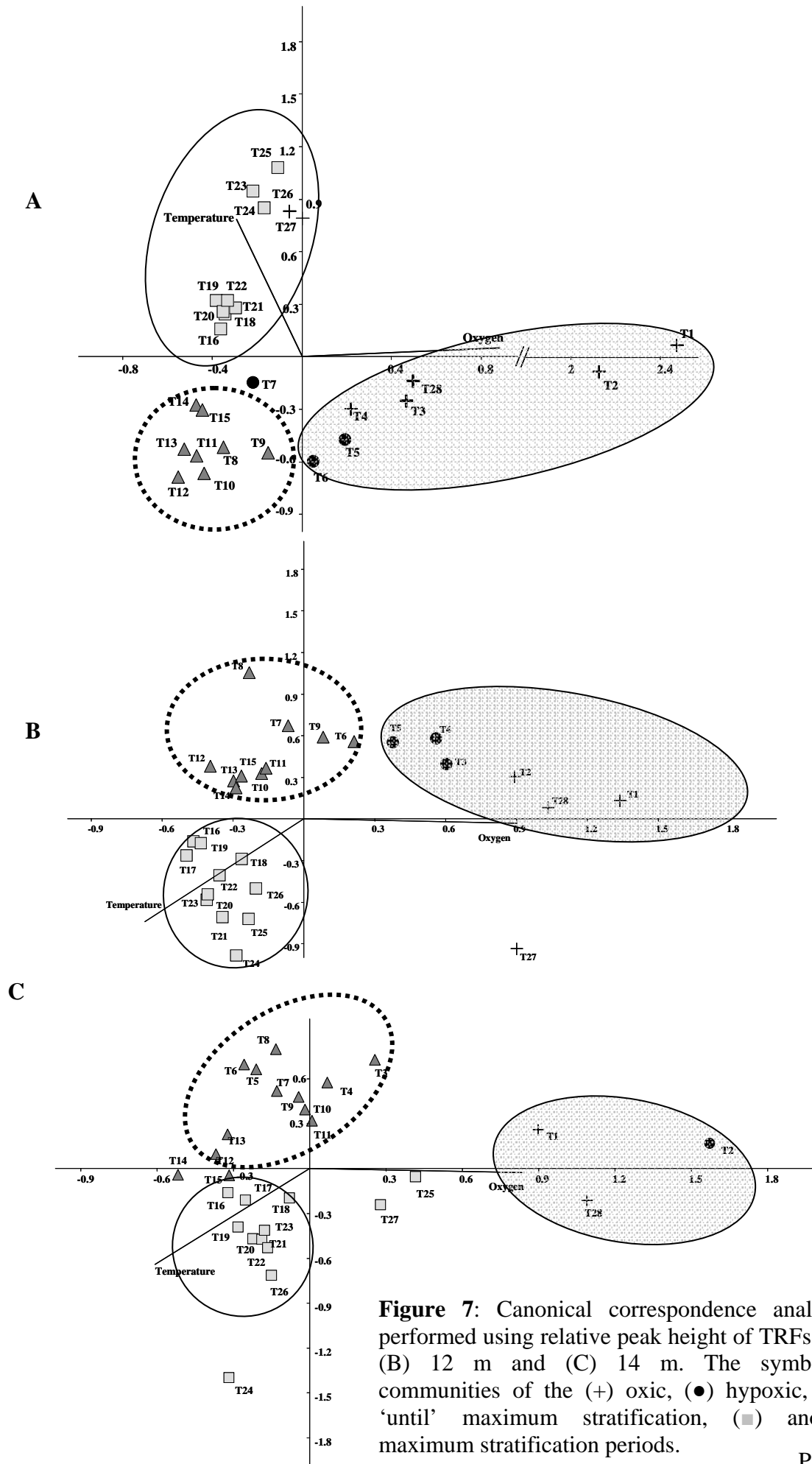


Figure 6: Similarity among TRFLP patterns illustrated by a correspondence analysis (COA). The numbers alone indicate the different dates at 10 m, the number followed by B correspond to the dates at 12 m and the number followed by C correspond to dates at 14 m. The fields □, ■, ▒ delimit the dates at 10, 12 and 14 m respectively. The scale of the two dimensional plot is indicated at the top.



period as noted in the COA and clustering analyses (Fig. 3C and 4C, Fig. 6). These results agree with the hypothesis that bacterial communities in the deepest water layers were adapted to these periodic changes in environmental conditions and that rare populations were probably maintained throughout the stratification period.

A sensitivity gradient to O₂ depletion?

Some observations suggest that bacterial communities in the hypolimnion of Lake Aydat exhibited a different “sensitivity” to the shift in O₂ concentrations: communities of the upper water layer (10 m) appeared to be more affected than those of the deeper water layers. For example, we noted that bacterial communities of the aerobic period “before” and “after” anoxia at 14 m and to a lesser extent at 12 m exhibited similarities (Fig. 3C and 4C); that changes in both TTGE and TRFLP community patterns at 10 m and 12 m directly corresponded to the depletion of oxygen; that a mixture of aerobic and anaerobic populations were observed after onset of anoxia at 14 m (cluster C1 Fig. 4C), and results from the canonical correspondence analysis revealed that oxygen concentrations explained more variability in the community at 10 m than at 12 m and 14 m (Fig. 7). Communities at 12 m may appear as ‘intermediate’ communities: they were similar to those at 14 m (Fig. 6) but they exhibited responses to O₂ depletion similar to communities at 10 m. From these observations, we hypothesize that a “sensitivity gradient” to the shift in environmental conditions (O₂ depletion or re-oxidation) may exist between communities of the upper and deeper layers of the hypolimnion. This difference in community responses may be the result of host native communities composed of persistent and well-adapted populations, in the deepest water layers, that may ensure the resilience of the systems after the periodic shift from oxic to anoxic conditions (or the opposite).

Global pattern

Succession of bacterial community in the hypolimnion of Lake Aydat followed orderly and gradual patterns with ‘cyclic’ trajectories at 12 and 14 m (Fig. 3C, 4C, 6). The hypolimnion of Lake Aydat is a dynamic system, periodically anoxic and periodically refreshed with oxygen. Bacterioplankton communities in this hypolimnion are probably in a constant rate of succession, shifting respiratory processes and phylogenetic composition as chemical conditions change over time, such as postulated by Crump et al. (2007). Also, bacterioplankton communities in several systems have been shown to reassemble year after year (Crump and Hobbie 2005, Furrman et al. 2006, Kan et al. 2006) suggesting that functional redundancy may be limited (Crump et al. 2007).

REFERENCES

- Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Carrias J-F, Portelli C (2003) Virioplankton and microbial communities in aquatic systems : a seasonal study in two lakes of differing trophicity. *Fresh Biol* 48:810-822.
- Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Dolan J (2004) Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 70:2941-2951.
- Billen G, Servais P, Becquevort S (1990) Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiologia* 207:37-42.
- Blackwood CB, Hudleston D, Zak DR, Buyer JS (2007) Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: Insights from simulated microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 73:5276-5283.
- Brune A, Frenzel P, Cypionka H (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol Rev* 24:691-710.
- Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian J Ecol* 8:117-143.
- Crump BC, Hobbie JE (2005) Synchrony and seasonality of bacterioplankton communities in two temperate rivers. *Limnol. Oceanogr.* 50:118-129.
- Crump BC, Peranteau C, Beckingham B, Cornwell JC (2007) Respiratory succession and community succession of bacterioplankton in seasonally anoxic estuarine waters. *Appl Environ Microbiol* 73:6802-6810.
- Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67: 190–197.
- Egert M, Friedrich MW (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 5:2555-2562.
- Engelbrektson JJ, Moyer CL (2003) Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 69:4823-4829.
- Finlay BJ, Maberly SC, Cooper JI (1997) Microbial diversity and ecosystem function. *Oikos* 80:209-213.
- Fuhrman JA, Hewson I, Schwalbach MS, Steele JA, Brown MV, Naeem S (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc Natl Acad Sci* 103:13104-13109
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan P D (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9pp.

- Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1997) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* 35:1-21.
- Jackson CR, Churchill PF, Roden EE (2001) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82:555-566.
- Jardillier L, Basset M, Domaizon I, Belan A, Amblard C, Richardot M, Debroas D (2004) Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquat Microb Ecol* 35:259-273.
- Kan JJ, Crump BC, Wang K, Chen F (2006) Determination of denitrification in the Chesapeake bay: predictable or random assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 51:215-2169.
- Lee DH, Zo YG, Kim SJ (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 63:3112-3120.
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology*, 2nd English ed. Elsevier, 853pp.
- Lehours AC, Bardot C, Thenot A, Debroas D, Fonty G (2005) Anaerobic microbial communities in Lake Pavin: a unique meromictic lake in France. *Appl Environ Microbiol* 71:7389-7400.
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès J, Godon J (2006) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and single strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ Microbiol* 8:720-731.
- Lüdemann H, Arth I, Liesack W (2000) Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl Environ Microbiol* 66: 754-762.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Martiny AC, Jørgensen TM, Albrechtsen HJ, Arvin E, Molin S (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 69:6899-6907.
- Michard G, Sarazin G, Jézéquel D, Albéric P, Ogier S (2001) Annual budget of chemical elements in a eutrophic lake, Aydat lake (Puy-de-Dôme), France. *Hydrobiologia* 459:27-46.
- Moeseneder M, Arrieta J M, Muyzer G, Winter C, Herndl G (1999) Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65:3518-3525.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.

- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Ogier S (1999) Diagenèse précoce en domaine lacustre : étude des composés minéraux et organiques des sédiments récents du Lac d'Aydat (Puy de Dôme, France). Thesis, Université d'Orléans, Orléans, France.
- Osborn MA, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis to the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2:39-50.
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.
- Pedros-Alíó C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* 14:257-263.
- Risatti JB, Capman WC, Stahl DA (1994) Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10173–10177.
- Sigler WV, Zeyer J (2004) Colony-forming analysis of bacterial community succession in deglaciated soils indicates pioneer stress-tolerant opportunists. *Microb Ecol* 48:316-323.
- Smith B, Wilson JB (1996) A consumers's guide to evenness indices. *Oikos* 76:70-82.
- Sneath PH, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.
- Suzuki MT, Giovannoni SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62:625-630.
- Vetriani C, Tran HV, Kerkhof LJ (2003) Fingerprint microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black sea. *Appl Environ Microbiol* 69: 6481-6488.
- Ward JH (1963). Hierarchical Grouping to optimize an objective function. *Journal of American Statistical Association* 58: 236-244.
- Weinbauer MG, Holfe MG (1998) Significance of viral lysis and flagellates grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 64:431-438.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bact* 173:697-703.
- Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu LY., Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV, Tiedje JM (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* 68:326-334.

I. DISCUSSION GENERALE

IV.1. Richesse, Diversité, et Structure du bacterioplancton anaérobie des lacs Pavin et Aydat.

Les premières analyses des communautés microbiennes des colonnes d'eau anoxiques par des approches électrophorétiques classiques (TTGE ou DGGE) ont suggéré que ces dernières étaient relativement peu diversifiées et notamment moins diversifiées que les communautés bactériennes des zones oxydées (**Hollibaugh et al. 2001, Ovreas et al. 1997**). Des études utilisant des approches plus résolutive ont, quant à elles, mis en relief que cette vision résultait d'une structure hétérogène des communautés anaérobies. En effet, la plupart des espèces dans les zones anoxiques des écosystèmes aquatiques semblent présentes à des abondances relatives faibles à très faibles (**Humayoun et al. 2003**) et sont donc indétectables par les méthodes classiques de séparation électrophorétique. Les études réalisées par T-RFLP ou par clonage séquençage sur le Mono Lake (**Humayoun et al. 2003**) et sur le Cariaco basin (**Madrid et al. 2001**) ont ainsi révélé que le bacterioplancton apparaît plus diversifié dans les zones anoxiques que dans les zones oxydées des écosystèmes étudiés. Les résultats obtenus sur les colonnes d'eau anoxiques du Lac Pavin et du Lac d' Aydat sont en accord avec ces dernières études, et la richesse phylotypique observée résulte en particulier d'un nombre élevé de phylotypes rares.

Ces observations soulèvent deux interrogations : Quels facteurs biotiques et/ou abiotiques peuvent expliquer que la richesse spécifique du bacterioplancton soit élevée dans les colonnes d'eau anoxiques des systèmes aquatiques et quelle est l'importance fonctionnelle des phylotypes très minoritaires ?

Les facteurs environnementaux contribuent sans nul doute à l'importante diversité du bacterioplancton anaérobie qui trouve une grande variété de niches écologiques, et permettent l'insertion des métabolismes anaérobies dans l'ensemble des cycles biogéochimiques. La stratification des donneurs et accepteurs d'électrons qui apparaît clairement dans les écosystèmes sédimentaires, suit le même schéma dans les colonnes d'eau anoxiques, l'échelle spatiale évoluant du centimètre au mètre (**Ramsing et al. 1996**). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence une stratification verticale du bacterioplancton (ex : **Giovannoni et al. 1996**) suggérant que les microorganismes avec différents *preferendum* occupent des niches déterminées par leur distribution verticale. L'importance de l'environnement physico-chimique dans la diversité phylotypique ne peut cependant pas être seul être pris en compte. Les processus de minéralisation anaérobie de la matière organique font intervenir une plus grande variété de voies métaboliques et d'interactions syntrophiques ou compétitives que les processus d'oxydation aérobie (cf. partie III Revue

bibliographique). Cette situation pouvant conduire à des processus de spécialisation métabolique induisant une importante diversité fonctionnelle.

Les mécanismes écologiques régissant les stratégies adaptatives et les processus interactifs (couplages syntrophiques, compétitions) peuvent être ainsi particulièrement exacerbés dans les zones anoxiques permanentes installées depuis de nombreuses années, comme le monimolimnion du Lac Pavin. Les adaptations et les spécialisations fonctionnelles en relation avec la diversification progressive des niches écologiques auraient conduit à l'installation de communautés spécialisées et diversifiées.

L'étude conduite sur le Lac d'Aydat révèle cependant que la richesse phylotypique des communautés bactériennes anaérobies est supérieure à celle observée dans le Lac Pavin. L'hypolimnion du Lac d'Aydat ne peut pourtant pas être considéré comme étant en état d'équilibre en raison des déstructurations fréquentes de la colonne d'eau. Cette observation annihile quelque peu l'hypothèse selon laquelle la structure hétérogène et la richesse phylotypique élevée du peuplement procaryotique anaérobie dans le Lac Pavin sont la résultante d'une longue évolution tendant vers un équilibre (climax).

Les processus impliqués dans ces deux écosystèmes sont cependant fondamentalement différents. En effet, le Lac Pavin présente une stabilité spatio-temporelle des paramètres physiques et chimiques de la colonne d'eau, suggérant que les communautés procaryotiques sont adaptées, spécialisées et occupent des niches écologiques bien définies. Par opposition, les communautés de l'hypolimnion du Lac d'Aydat, périodiquement déstructuré, sont contraintes par des fluctuations environnementales de fortes amplitudes. Des niches écologiques sont donc régulièrement créées et détruites, et l'hypothèse de la perturbation intermédiaire peut être avancée comme argument pour interpréter la richesse spécifique élevée dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat en période de stratification. La forte richesse phylotypique observée peut également refléter l'opportunisme de certaines communautés, comme par exemple des anaérobies facultatives, qui se maintiennent entre la période aérobie et le passage à des conditions anoxiques. Ces espèces, sélectionnées en raison de leur résistance à la perturbation, assurent ainsi la résilience du système, modifient le milieu, le stabilisent et permettent l'installation ultérieure d'autres espèces dirigeant ainsi les successions autogéniques.

Considérant les caractéristiques propres de ces zones anoxiques (ex : monimolimnion en anoxie permanente - hypolimnion en anoxie transitoire), les communautés bactériennes de chacune de ces strates présentent une composition qualitative drastiquement différente, quelle que soit la profondeur considérée ou la période d'échantillonnage (states pionniers ou matures des successions dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat, Figure C. 10). Cependant la structuration des

communautés est globalement similaire. En effet, que l'on s'adresse aux communautés bactériennes anaérobies du Lac Pavin ou du Lac d'Aydat, la forte richesse phylotypique observée est le résultat d'un nombre élevé de phylotypes minoritaires. Pour ces deux écosystèmes, nous avons suggéré que la redondance fonctionnelle puisse être un facteur explicatif, les espèces minoritaires "attendant en coulisses" que les conditions leur deviennent favorables (espèces vicariantes).

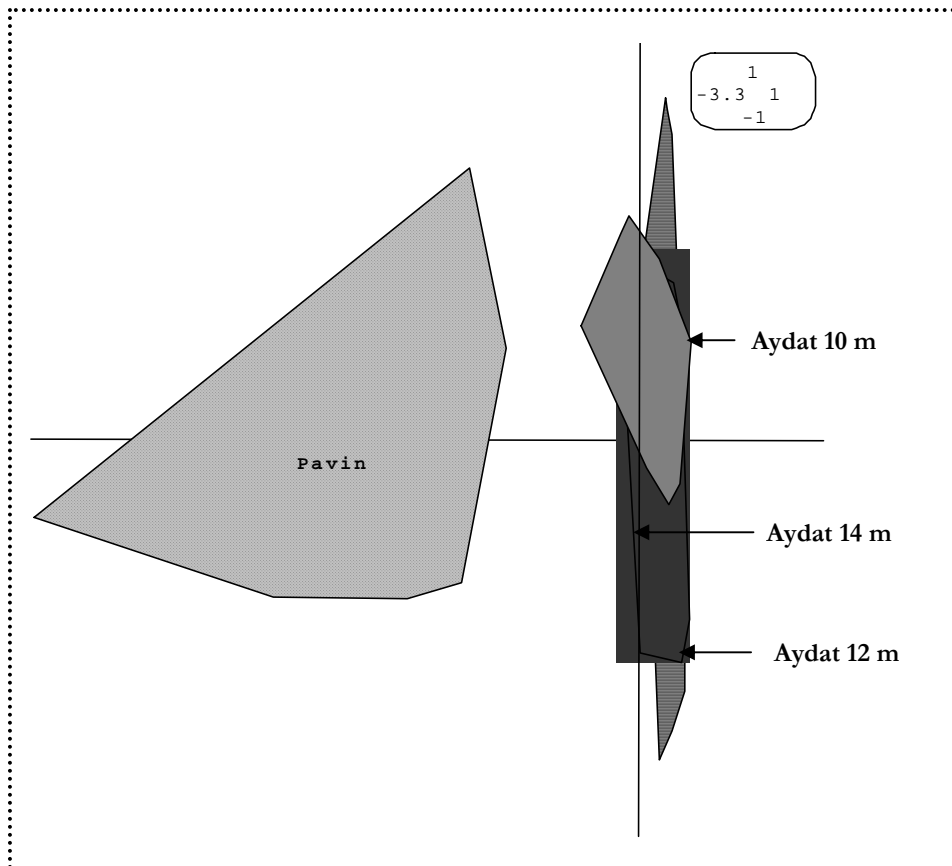


Figure C. 10 : Analyse factorielle des correspondances présentant les similarités entre les compositions qualitatives (présence/absence) des fragments de restriction (TRFs) obtenus sur les études réalisées sur le Lac Pavin et sur le Lac d'Aydat. (Réalisée avec la logiciel R du package ADE4 (<http://cran.r-project.org/>))

D'après la définition de la niche écologique d'Odum (« *L'habitat d'une espèce est son adresse, sa niche est sa profession* »), la niche d'une espèce peut varier en fonction de son abondance. Ainsi, en cas de déplétion, son rôle peut être assuré par une autre espèce, la première espèce reste en réserve, prête à pallier à un effondrement ultérieur de la seconde. De fait, dans la nature il est fréquemment observé dans les biocénoses que plusieurs espèces sont présentes à un faible niveau d'abondance mais sont prêtes à se multiplier en remplaçant l'espèce dominante si celle-ci disparaît (Frontier et Pichod-Viale 1998). Il apparaît cependant que cette redondance fonctionnelle

putative s'exprime également pour les phylotypes majoritaires. En effet, dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat, les abondances relatives des deux phylotypes prédominants (TRFs 502 et 505 pb) présentent des fluctuations de grande amplitude ainsi que des dynamiques inverses.

IV. 2. Successions spatio-temporelles.

Afin de comparer, sur une même base, les similarités entre les différentes profondeurs et les différentes dates d'échantillonnages, des dendrogrammes ont été réalisés pour le Lac Pavin ([Figure C.12](#)) et pour le Lac d'Aydat ([Figure C.11](#)). Pour le Lac Pavin, la distance maximale entre les clusters est de 0.5, soit environ la moitié de la distance observée entre les communautés pionnières et matures pour le Lac d'Aydat à une même profondeur ([Article 2, Figure C.11](#)). D'autre part, la distance entre les dates d'échantillonnage à 10 m et de 14 m est proche de 2 pour le Lac d'Aydat ([Figure C.11](#)). Considérant que le fort gradient physico-chimique du monimolimnion du Lac Pavin, ce dernier conditionne sans nul doute une spécialisation métabolique des communautés bactériennes inféodées à chacune de ces profondeurs. Il peut ainsi apparaître surprenant que la stratification spatiale dans cette zone profonde soit moins discriminante que le gradient temporel et spatial de l'hypolimnion du Lac d'Aydat.

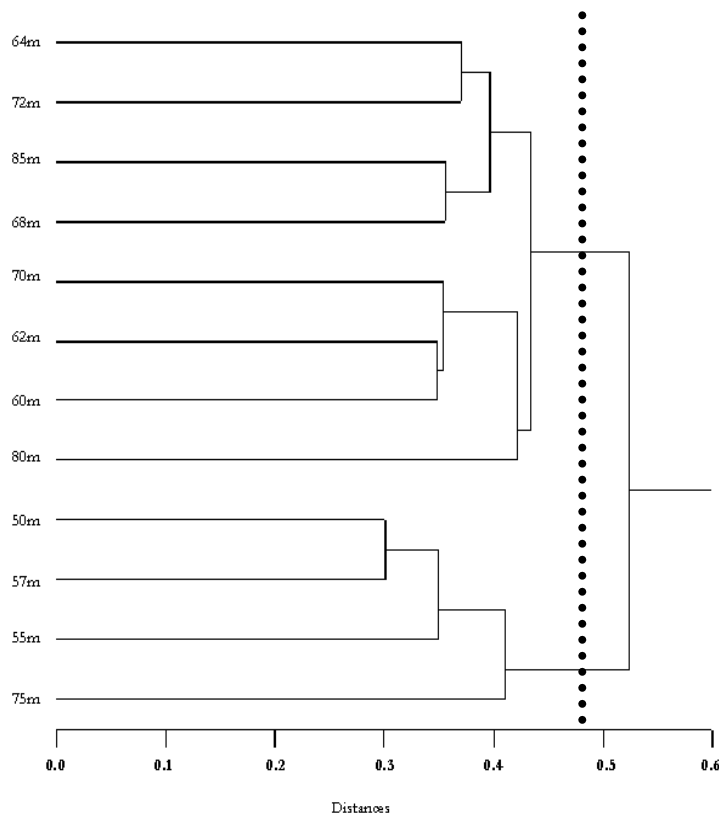


Figure C.12 : Dendrogramme illustrant la similarité entre les différentes profondeurs d'échantillonnage dans le Lac Pavin. Le dendrogramme a été réalisé en utilisant la distance euclidienne et le coefficient d'agrégation de Ward sur le logiciel SYSTAT 10.

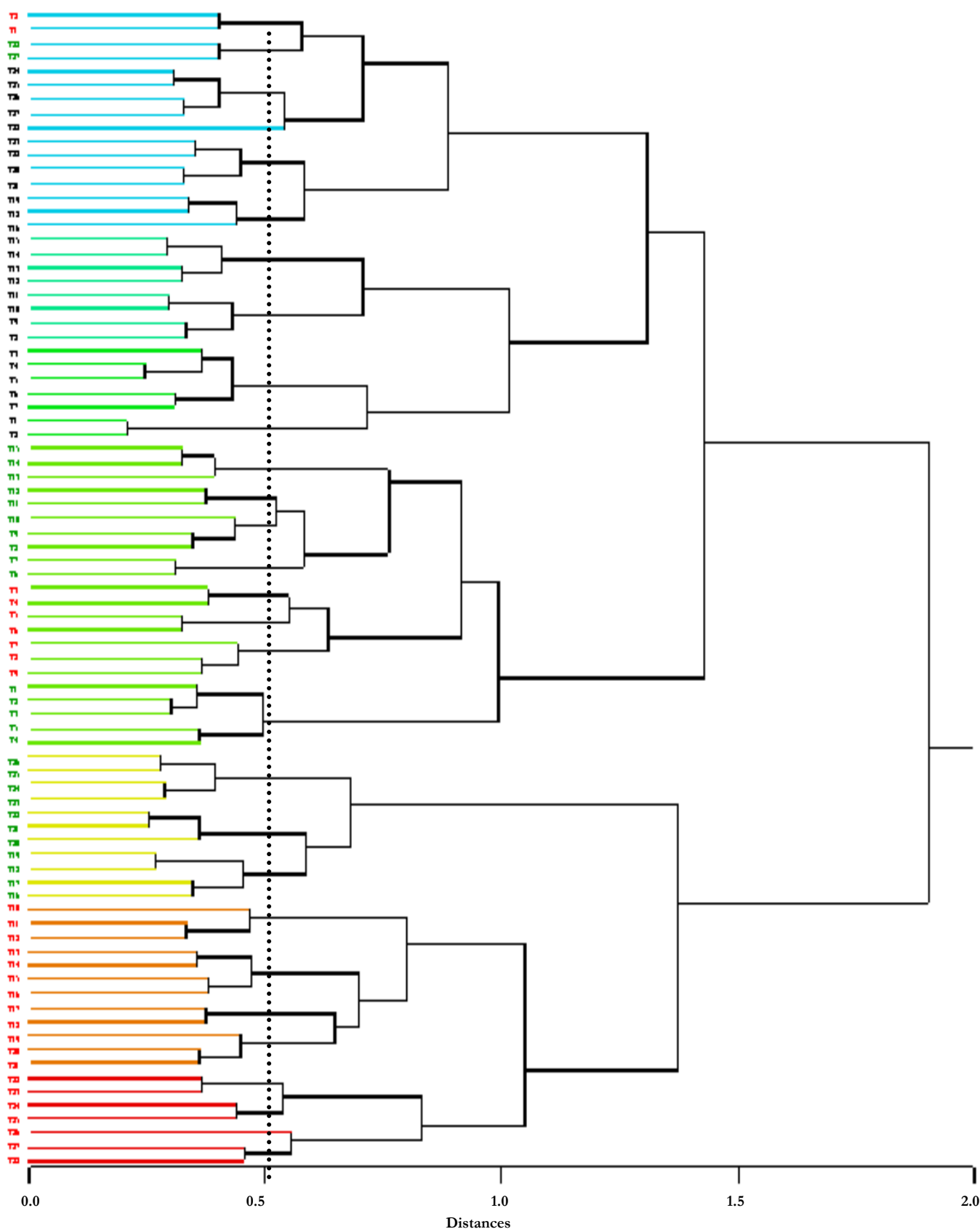


Figure C.11: Dendrogramme illustrant la similarité entre les différentes dates et profondeurs d'échantillonnage dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat (en noir les dates correspondant à la profondeur 10m, en vert celles correspondant à 12 m et en rouge celles correspondant à 14m). Le dendrogramme a été réalisé en utilisant la distance euclidienne et le coefficient d'agrégation de Ward sur le logiciel SYSTAT 10.

La forte dissimilarité entre les stades pionniers et matures à une même profondeur dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat est cependant en accord avec le processus de successions écologiques qui conduit à une spécialisation progressive d'espèces de plus en plus adaptées à l'environnement anoxique et qui établissent entre elles un réseau d'interactions de plus en plus complexe. L'analyse factorielle des correspondances réalisée dans l'étude sur le Lac d'Aydat (Article 2) montre un regroupement entre les stades finaux des successions des communautés bactériennes à la profondeur 10 m et les stades intermédiaires à 12 et 14 m. Cette similarité de plus en plus forte entre les communautés de ces différentes profondeurs, suggère qu'une période d'anoxie plus longue aurait pu conduire à une plus grande homogénéité dans la composition des communautés bactériennes de l'hypolimnion.

Les études ultérieures des communautés microbiennes anaérobies des colonnes d'eau anoxiques se sont focalisées sur le monimolimnion du Lac Pavin. Il serait, cependant, intéressant de poursuivre l'étude sur le Lac d'Aydat, en s'assurant que les différents stades définis traduisent bien un processus de successions reproductible. D'autre part, l'identification des espèces représentées par les TRFs majoritaires par des approches moléculaires et culturelles serait pertinente. Afin de déterminer si le sédiment constitue un "réservoir" potentiel d'espèces anaérobies conditionnant la colonisation progressive de la colonne d'eau anoxique, il sera nécessaire d'analyser la composition des communautés bactériennes de ce dernier et de coupler l'étude des successions bactériennes avec une analyse simultanée des flux en provenance du sédiment.

IV.3. Premières hypothèses sur les métabolismes putatifs des communautés microbiennes anaérobies du Lac Pavin.

La première étude conduite sur les communautés microbiennes anaérobies du Lac Pavin (Article 1), est essentiellement descriptive et l'ensemble des extrapolations qui sont faites dans cette section constitue une base de réflexion ayant dirigé les travaux menés par la suite.

La présence de bactéries sulfato-réductrices, notamment au niveau de la chémocline, est en accord avec les résultats de **Amblard et Restituto (1983)**, et suggère que l'hydrogène sulfuré est en partie d'origine biogénique. Une occurrence simultanée des communautés de bactéries sulfato-réductrices et d'*Archaea* méthanogènes a été observée. Si le paradigme de l'exclusion mutuelle a été annihilé depuis quelques années, il n'en demeure pas moins que les faibles concentrations en sulfates dans ce monimolimnion (*cf.* Présentation des sites d'études) sont

difficilement conciliables avec une activité de sulfato-réduction pouvant être compétitive de la méthanogénèse. Considérant l'environnement géochimique (*cf.* Présentation des sites d'études) dans lequel évoluent ces communautés de BSR et d'AM, plusieurs hypothèses peuvent ainsi être avancée. Le fer constitue l'oxydant majoritaire de cette zone profonde et certaines BSR présentant la capacité de réaliser la réduction dissimilatrice du fer, il peut ainsi être envisagé que ces dernières soient impliquées dans le cycle biogéochimique de cet élément. D'autre part, les profils de concentrations en méthane ainsi que les mesures isotopiques du CO₂, révèlent que le méthane n'est pas inerte dans cette zone profonde et que le CO₂ présente un appauvrissement plus important en ¹³C que le modèle théorique. Ainsi, une hypothèse intéressante (à confirmer) est l'existence d'un couplage syntrophe entre l'oxydation anaérobie du méthane et la réduction du Fe(III) selon le scénario proposé Figure C.13.

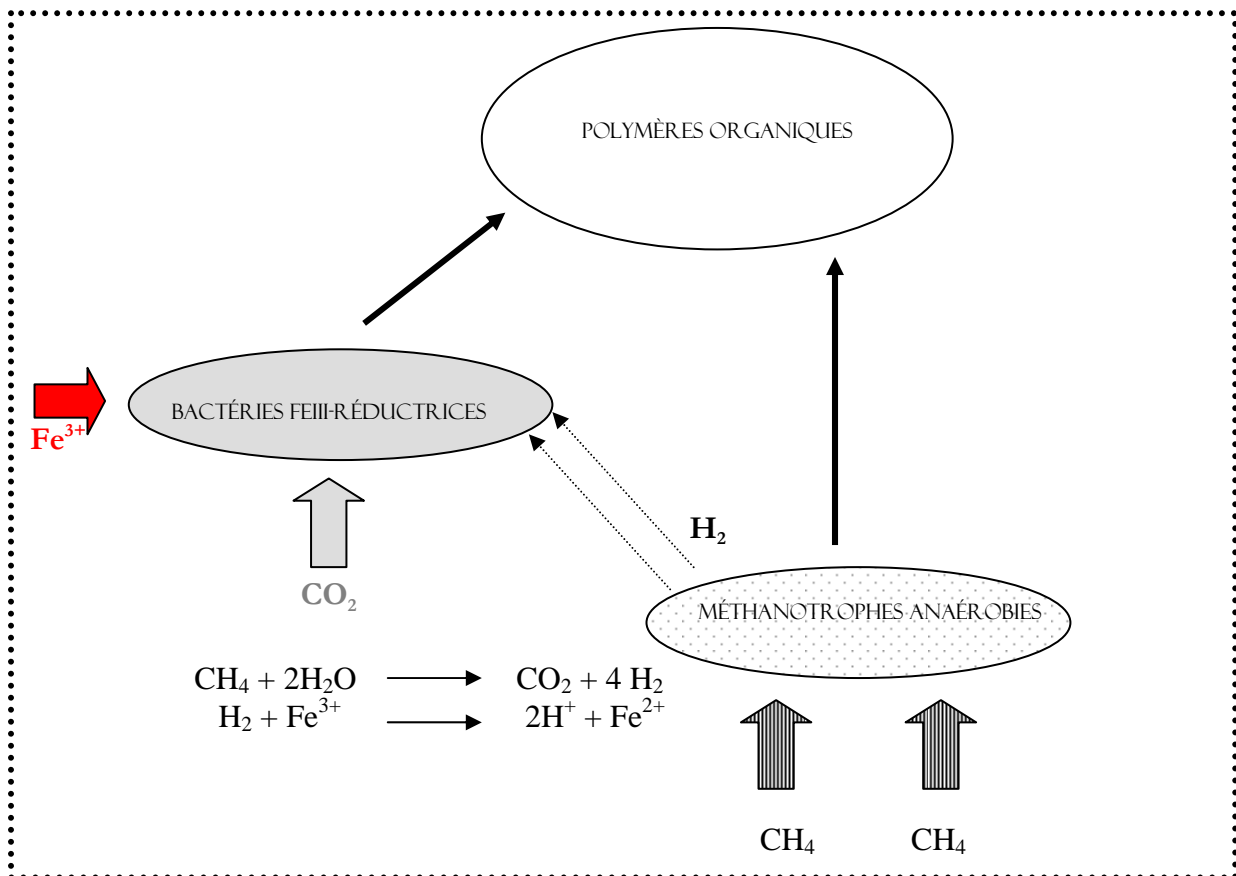


Figure C.13 : Schéma d'un scénario anaérobie basé sur la réduction du fer couplé à l'oxydation du méthane.

CHAPITRE II

Diversité phylogénétique des communautés microbiennes
de la zone anoxique du Lac Pavin

CHAPITRE II: DIVERSITE PHYLOGENETIQUE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES DE LA ZONE ANOXIQUE DU LAC PAVIN

I. INTRODUCTION GENERALE.

L'origine volcanique du Lac Pavin confère à la strate anoxique profonde des caractéristiques physico- et géo-chimiques très particulières (cf. Présentation des sites d'études). Les faibles contraintes de forçage actant sur cette dernière accentuent cette originalité en lui procurant un isolement relatif des échanges extérieurs. Il est ainsi probable que les communautés microbiennes, inféodées à cette zone profonde, présentent un fort particularisme génotypique et phénotypique.

L'étude de la diversité et des relations phylogénétiques des communautés procaryotiques anaérobies de ce lac a ainsi été principalement motivée par l'identification des espèces dominantes en réponse à la question "*Qui sont elles ?*". Les analyses ont été particulièrement focalisées sur trois zones d'interface : 60 m [interface mixolimnion/chémocline], 70m [interface chémocline/sub-chémocline], et 92 m [interface eau/sédiment]. En effet, les résultats de la première étude conduite sur ces communautés anaérobies (Article 1) suggèrent que ces "zones de transition" jouent un rôle prépondérant dans le fonctionnement global du système. La profondeur 90 m (2 m au-dessus du sédiment) a également été échantillonnée afin d'analyser l'influence du sédiment sur la composition des communautés microbiennes pélagiques des strates les plus profondes (par comparaison avec les communautés de l'interface eau/sédiment). Les résultats de cette étude sont présentés dans l'Article 3. Le protocole général de la méthode de clonage séquençage étant détaillé dans cet article, une section "Matériel et Méthodes" ne sera pas spécifiquement dévolue à cette technique. En revanche nous rappelons succinctement au lecteur les différentes méthodes de reconstruction phylogénétique avant la présentation de l'Article 3 et élargirons la discussion à l'ensemble de la problématique du monimolimnion du Lac Pavin (§IV).

II. PRINCIPES DE LA RECONSTRUCTION PHYLOGENETIQUE

"Biodiversity is monophyletic : life started with a single species" (Boero 2004)

La vie est apparue sur terre il y a 3,5 milliards d'années et tous les organismes actuels dérivent d'ancêtres communs apparus à cette époque. Le processus de reproduction n'étant pas entièrement fidèle, de petites différences s'installent à chaque génération permettant l'évolution des espèces voire l'apparition de nouvelles espèces. Selon Lamarck (1744-1829), l'évolution

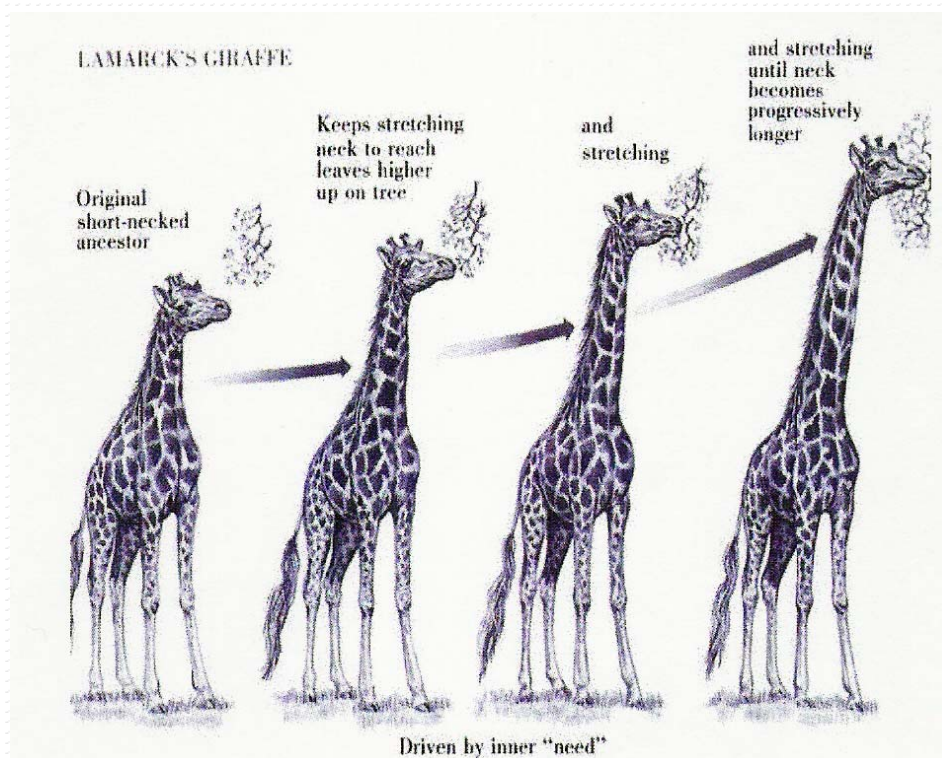


Figure C. 12. L'Evolution selon Lamarck

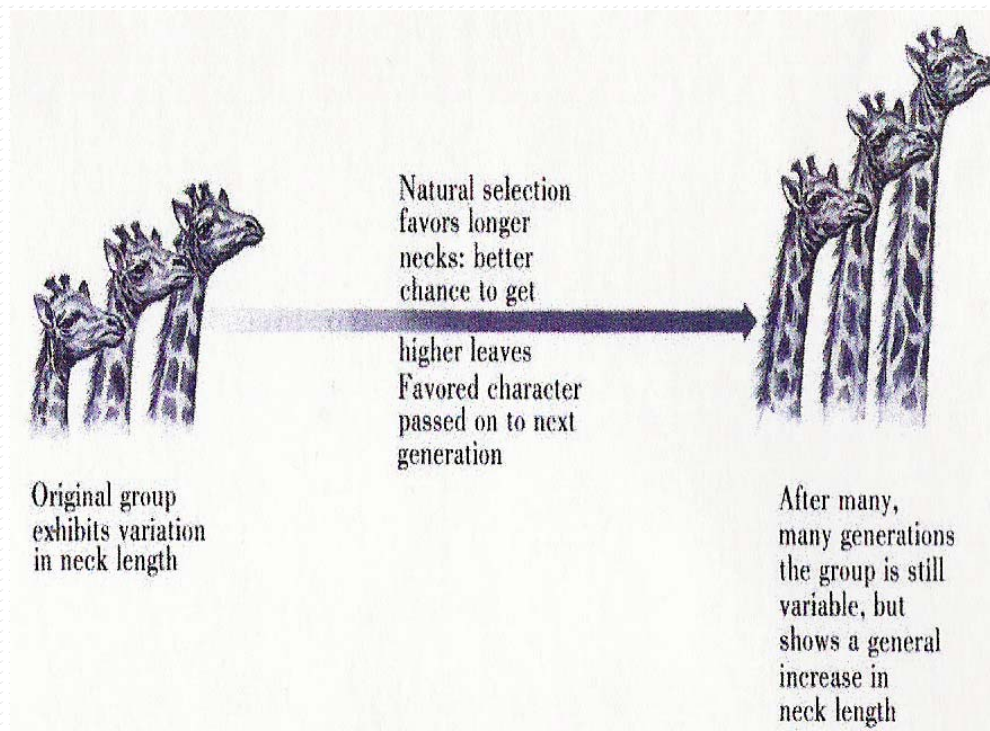


Figure C. 13 : L'Evolution selon Darwin

résulterait d'une adaptation continue de l'organisme à son environnement : un organisme s'adapterait en modifiant son comportement et en utilisant certains organes plus que d'autres, lesquels se modifieraient en fonction des nouveaux besoins (Figure C. 12). La théorie défendue par Darwin (1809-1882) est celle de l'évolution par sélection naturelle : les individus les mieux adaptés se reproduiraient plus que les moins adaptés (Figure C.13). La vie évoluerait ainsi perpétuellement vers un état de mieux en mieux adapté à l'environnement.

Les progrès de la biologie et la connaissance des lois de la génétique ont permis de traduire cette notion en terme de mutation et de l'appliquer aux gènes. L'accumulation progressive des mutations au sein des génomes constitue une information cruciale sur l'histoire des espèces. En 1965, **Zuckerland et Pauling** ont introduit la notion d'horloge moléculaire : chaque région du génome accumule des mutations à un rythme qui lui est propre et dicté par l'intensité de la pression de sélection à laquelle elle est soumise. Sur la base de ces lois, il est possible de reconstruire l'histoire évolutive des organismes vivants, pour ce faire, les séquences d'ARN ribosomiaux se sont rapidement imposées comme molécules marqueurs.

La phylogénie moléculaire constitue donc une branche de la systématique et consiste à déterminer l'arbre phylogénétique d'un ensemble de séquences homologues données (ou OTU¹), c'est à dire la configuration la plus probable pour rendre compte du degré de parenté existant entre ces séquences.

II.A. Principales étapes permettant la création d'un arbre phylogénétique

II.A.1. L'alignement de séquences

Cette étape est décisive pour obtenir un alignement de bonne qualité et consiste à mettre en regard des nucléotides homologues. Le travail d'alignement est particulièrement délicat et si des logiciels d'alignement automatique existent, les alignements nécessitent d'être réajustés manuellement. Deux nucléotides pourront être homologues et informatifs pour deux espèces proches alors qu'ils ne le seront pas pour deux espèces lointaines. En outre, les phénomènes d'homoplasie² compliquent l'analyse des séquences dans les régions hypervariables. En fonction des séquences à analyser, il convient donc de déterminer quelles sont les positions informatives et de délimiter les zones réellement comparables au moyen de masques. Pour évaluer la confiance

¹ OTU : Operationnal Taxonomic Unit

² Homoplasie : Similarité ne dérivant pas d'un caractère ancestral mais étant consécutive à des événements de type réversion (changement dans une séquence annulé par un second changement (G → C), parallélisme (changements parallèles dans deux séquences conduisant à des nucléotides identiques) ou convergence (séquences ancestrales différentes qui évoluent vers des séquences identiques).

Méthodes	Séquences	Avantages	Inconvénients	Programme	Remarques
Distances	Très proches	Rapides Faciles à mettre en œuvre	Tous les sites sont traités de manière équivalente (perte d'informations) Non applicable à des séquences éloignées	KITSCH FITCH PROTdist DNADIST	Mieux vaut utiliser le Neighbor-Joining que UPGMA car NJ autorise des taux de mutations différents le long des branches Possibilité d'introduire des corrections
Parcimonie	Relativement éloignées	Evaluation de différents arbres Essaie de donner des informations sur les séquences ancestrales	Lente Inutilisable pour un grand nombre de séquences	DNAPars PROTPars	On peut obtenir différents arbres et dans ce cas, le choix de l'un par rapport à l'autre peut être difficile à justifier
Maximum de vraisemblance	éloignées	Robuste Taux de transitions/transversions différents Estimation de la longueur des branches de l'arbre final	Lente Inutilisable pour un grand nombre de séquences	DNAML	

Tableau C.8. Récapitulatif des différentes méthodes de reconstruction phylogénétique.

que l'on peut avoir d'un alignement, on peut également s'assurer que les séquences signatures d'un groupe phylogénétique sont bien en regard les unes des autres et analyser les structures secondaires.

II.A.2. Méthodes de reconstruction (Tableau C.8)

L'analyse phylogénétique repose sur des hypothèses quant à la nature de l'évolution des gènes. Ces hypothèses ont été modélisées en utilisant des méthodes mathématiques et l'analyse phylogénétique est désormais réalisable *via* un ensemble de programmes informatiques (exemples : "*packages*" ARB, PHYLO-WIN, GCG, PHYLIP)

A- Les méthodes de distance :

Elles sont basées sur l'analyse du nombre de substitutions de nucléotides entre des séquences prises deux à deux. Ce sont des méthodes rapides qui donnent de bons résultats pour des séquences très proches. Les plus couramment utilisées sont détaillées ci-dessous :

■ **La méthode UPGMA** ("*Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean*") utilise un algorithme de "clusterisation" séquentiel dans lequel les relations sont traitées dans l'ordre de leur similarité. Les deux séquences les plus proches seront identifiées et comparées puis sera ajoutée la séquence la plus proche de ce doublet et ainsi de suite jusqu'à la reconstruction de la matrice générale. Cette méthode est sensible à l'ordre dans lequel les séquences sont introduites et à des taux de mutations différents sur les différentes branches. Elle n'est utilisable que pour des comparaisons de séquences ayant une forte similarité.

■ **La méthode de "Neighborg-Joining"** (Saitou et Nei 1987) dérive de la méthode UPGMA et autorise un taux de mutation différent sur les différentes branches. Une matrice initiale est construite en groupant deux à deux les espèces les plus proches, puis cette matrice de distance est corrigée afin de prendre en compte la divergence moyenne de chacune des espèces avec les autres. Cette nouvelle matrice de distances servira de base à la construction de l'arbre phylogénétique. Cet algorithme permet de construire rapidement un arbre selon l'évolution minimale. Les inconvénients majeurs de cette méthode sont qu'elle n'est pas applicable à des séquences très éloignées et qu'elle traite tous les sites de manière équivalente induisant une perte d'information.

Les méthodes de distances conduisent à une sous estimation du nombre d'événements mutationnels car les substitutions sont simplement dénombrées et ne sont pas pondérées. Or des phénomènes de mutations reverses et de mutations multiples peuvent se produire. Les différentes

corrections proposées pour atténuer ce biais sont basées sur des hypothèses sur la substitution de bases à un locus donné.

- La correction de Jukes et Cantor (1969) fait l'hypothèse que toutes les mutations ont une probabilité égale (les transitions purine/purine ou pyrimidine/pyrimidine et les transversions purine/ pyrimidine ont le même poids) mais qu'elles varient au cours du temps et qu'il n'y a eu ni insertions, ni délétions. Si cette hypothèse apparaît la plus simple, elle n'est pas forcément la plus correcte.
- La correction de Kimura (1980) fait l'hypothèse que le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions car ces dernières sont beaucoup plus fréquentes que les transversions.

B- Les méthodes fondées sur les caractères.

Ces méthodes de calculs sont longues mais relativement précises, elles s'intéressent au nombre d'événements mutationnels qui affectent chacun des sites.

■ La méthode du maximum de parcimonie (Fitch 1971) vise à construire l'arbre le plus parcimonieux possible en minimisant le nombre de mutations nécessaires pour passer d'une séquence à une autre. Cette méthode implique que la vitesse d'évolution soit constante et lente et que les sites évoluent indépendamment les uns des autres (ce qui n'est pas forcément le cas !). Tous les sites présentant des nucléotides identiques sont considérés comme non informatifs et ne sont pas pris en compte dans les calculs. Les calculs sont par conséquent réalisés sur un nombre restreint de sites "dits informatifs". Le logiciel va rechercher toutes les typologies d'arbre possible et par conséquent, la durée nécessaire à cette analyse va croître exponentiellement avec le nombre de séquences. Au final, seul l'arbre le plus parcimonieux sera conservé. La méthode du maximum de parcimonie pouvant conduire à plusieurs arbres aussi parcimonieux les uns que les autres, un arbre consensus va pouvoir être construit. Il comportera les nœuds les plus fréquemment rencontrés sur les différents arbres possibles.

Les inconvénients de cette méthode sont multiples : elle ne s'intéresse qu'aux positions informatives et ne prend donc en compte qu'une partie de l'information, elle ne pondère pas les substitutions multiples par rapport aux substitutions simples, elle ne donne aucune information sur les distances relatives entre les différents groupes et elle est sensible au biais des codons. En outre, cette technique est inutilisable lorsque l'on a un grand nombre de séquences.

■ La méthode du maximum de vraisemblance (Felsenstein 1973) : cette méthode probabiliste est basée sur des théories statistiques élaborées. Elle va calculer la probabilité de chaque branche de se trouver à une position donnée dans l'arbre phylogénétique et estimer sa

longueur sous un modèle évolutif donné. Cette méthode pondère de manière différente les événements de transitions ou de transversions. L'arbre qui résultera de l'analyse sera celui possédant la vraisemblance la plus élevée. Cette méthode est robuste et permet de comparer des séquences très éloignées mais elle est inutilisable lorsque le nombre de séquences devient trop important.

II.B. Estimation de la robustesse des arbres

Toutes les méthodes d'analyse phylogénétique présentent des avantages et des inconvénients, mais aucune n'incorpore tous les aspects des mécanismes biologiques de l'évolution des séquences. Aucune de ces méthodes n'est donc susceptible de fournir un "arbre phylogénétique vrai" et l'application de différentes méthodes phylogénétiques sur un même jeu de séquences est donc susceptible de fournir des topologies différentes.

On estime généralement que seules les branches retrouvées par les trois méthodes (Maximum de vraisemblance, maximum de parcimonie et Neighbor-Joining) sont susceptibles d'être une bonne image de la réalité (Huelsenbeck et Hillis 1993). Actuellement, pour reconstruire une bonne phylogénie, une analyse de la robustesse de l'arbre est généralement réalisée. Si différentes méthodes existent (exemples : le "*delete-half-Jackknifing*"[‡], la méthode de permutation[§]), l'analyse de "*bootstrap*" est sans doute la plus utilisée (Felsenstein 1985). Cette méthode d'échantillonnage permet d'examiner comment la stabilité de l'arbre est influencée par la suppression de certaines informations. Des arbres phylogénétiques sont construits à partir de la matrice de données initiale dans laquelle des tirages aléatoires avec remise sont réalisés. Cette opération est réalisée 100 et

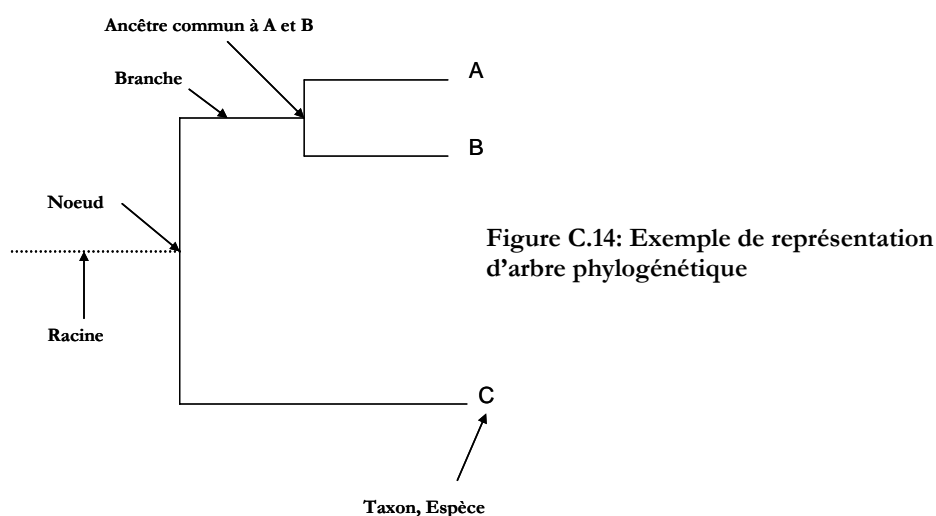


Figure C.14: Exemple de représentation d'arbre phylogénétique

[‡] delete-half-Jackknifing : cette méthode ré échantillonne la moitié des sites des séquences et élimine le reste. Cette méthode donne des résultats très similaires à ceux obtenus par bootstrap.

[§] Méthode de permutation : basée sur la permutation des colonnes de la matrice. Cette méthode teste l'hypothèse qu'il y a bien une taxonomie dans les données actuelles.

1000 fois et un arbre est calculé pour chaque échantillonnage. Les différentes topologies d'arbre sont ensuite comparées et compilées en un arbre consensus et un pourcentage de robustesse est attribué à chacun des nœuds de l'arbre en fonction du nombre de fois ou celui-ci a été trouvé à cette position.

Les pourcentages inférieurs à 50% ne sont généralement pas pris en considération. La topologie de l'arbre est particulièrement sensible à la qualité du ou des groupes extérieurs ("*outgroup*"^{**}) choisi pour la reconstruction phylogénétique. L'"*outgroup*" doit être suffisamment distant des autres séquences pour permettre de les discriminer et de les positionner les unes par rapport aux autres sans toutefois l'être trop au risque de ne plus être discriminant du tout et de conduire à une topologie d'arbre écrasé (phénomène d'attraction des longues branches, **Philippe 2000**).

^{**} Out-group : permet d'enraciner un arbre

III. RESULTATS

ARTICLE 3

Diversité phylogénétique des *Archaea* et des *Eubacteria* dans la zone anoxique d'un lac méromictique (Lac Pavin, France)

Lehours Anne-Catherine, Paul Evans, Corinne Bardot, Keith Joblin,
et Gérard Fonty.

Applied and Environmental Microbiology

Résumé : La composition des populations d'*Archaea* et d'*Eubacteria* de la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin a été déterminée dans cette étude. L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons d'eau prélevés à 90-m, et à trois zones d'interface : 60-m (interface mixolimnion/chémocline), 70-m (interface chémocline/sub-chémocline), et 92-m (interface eau/sédiment). Pour chaque échantillon, des amplifications ont été réalisées indépendamment pour les *Eubacteria* et les *Archaea* en utilisant des couples d'amorces spécifiques de ces deux domaines. Huit bibliothèques de clones ont ainsi été construites. Afin d'analyser la diversité des communautés procaryotiques des quatre sites échantillonnés, six arbres phylogénétiques ont été réalisés à partir des séquences obtenues.

La majorité des séquences d'*Eubacteria* sont affiliées à quatre phylum : *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* (incluant les genres *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Bacteroides*), *Verrucomicrobia*, et la Division Candidate OP11. Les communautés bactériennes présentent de faibles pourcentages de similarité (<27%) entre les 4 zones d'étude. Si les *Proteobacteria* dominent la communauté à 60-m, leur contribution relative décroît avec la profondeur ; ce phylum étant majoritairement représenté par des bactéries affiliées à la sub-division *delta-Proteobacteria* à 70-m 90-m et 92-m

La majorité des séquences (70%) d'*Eubacteria* présentent de faibles degrés de parenté avec des séquences issues de bactéries cultivées ou de clones environnementaux présents dans les banques de données. Seulement 8 OTUs sur 117 sont affiliés à des bactéries cultivées, ne permettant pas d'extrapoler sur la fonction et le rôle écologique putatif des bactéries anaérobies du Lac Pavin au sein de la strate anoxique profonde. Par opposition, les populations d'*Archaea* sont peu diversifiées et fortement similaires entre les profondeurs (>92%). La majorité des séquences archéennes sont affiliées aux *Euryarchaeota* et plus particulièrement à l'ordre des *Methanosarcinales* (56%), alors que seulement 2 OTUs sont affiliés aux *Crenarchaeota*.

Les résultats obtenus révèlent une grande originalité des communautés bactériennes de la zone anoxique du Lac Pavin, alors que les populations d'*Archaea* apparaissent similaires avec celles rencontrées dans d'autres écosystèmes.

Phylogenetic diversity of *Archaea* and *Bacteria* in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France)

Anne-C. Lehours^{1*}, Paul Evans², Corinne Bardot¹, Keith Joblin², and Gérard Fonty¹

¹Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France.

² Grasslands Research Centre, AgResearch, Tennent Drive, Private Bag 11008, Palmerston North, New Zeland.

ABSTRACT

The compositions of archaeal and bacterial populations at different depths [60-m (mixolimnion/chemocline interface), 70-m (chemocline/sub-chemocline interface), 90-m, and at 92-m (the water-sediment interface)] in the anoxic zone of the water column in Lake Pavin, a freshwater permanently-stratified mountain lake in France, were determined. Phylogenetic trees were constructed from sequences to assess archaeal and bacterial diversity at the 4 sites.

Permanent anoxic layers in natural freshwater basins are rare and of considerable interest to microbial ecologists because of their potential undisturbed climax microbial communities, and because of their relationship to an earlier biosphere. Lake Pavin in France provides such an environment. It is unusual because the water column has been stratified for a very long period and there has been a lack of mixing (meromixis), and its anoxic zone is in steady state (2). Despite its unique character, information on the distribution of microbial communities in the anoxic water column of Lake Pavin is limited to a Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP) study of populations (17). Lehours *et al.* (17) found that the structure of both the bacterial and archaeal communities changed with depth. Their results suggested that communities at interfaces played a predominant role in the water column. To obtain detailed phylogenetic information on the diverse populations in the differing anaerobic communities, 16S rRNA genes in samples collected at three interface layers in the anoxic water column of Lake Pavin were amplified, cloned, sequenced and analyzed. Bacterial and archaeal clone libraries were also constructed from a 90-m sample adjacent to the sediment to determine whether sediment fluxes influenced lake-bottom community composition.

Sample collection and library construction: Samples were collected in August 2004 from 60-m, 70-m and 90-m, using a 8 L horizontal Van Dorn bottle, and from the sediment-water interface (Inter) at 92-m using a Jenkin-Mortimer multiple corer (22) in the water column of Lake Pavin (see reference 17 for site characteristics). Microbial samples were prepared on-site from water samples by filtration (500 ml) through polycarbonate membrane filters (47 mm diameter; pore size 0.2 µm; GTTP, Millipore) and stored at -80 °C. The sites sampled in the water column are shown in Figure 1.

DNA was extracted as previously described (15). 16S rRNA genes were amplified using the 21f *Archaea*-specific (5) and 27f *Bacteria*-specific (8) forward primers and the universal primer 1492r (14). PCR products were cloned using a TOPO TA cloning Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen corporation, San Diego, CA, USA). Cloned inserts were PCR amplified using the M13 forward and reverse primers and amplicons were digested with the restriction endonuclease HaeIII (Qbiogene). The banding patterns were grouped according to similarity, and plasmid DNA from a single representative of each unique restriction fragment lengthpolymorphism (RFLP) pattern was isolated using the QIAprep plasmid purification kit (Qiagen, Chatsworth, Calif.). Clones sequenced in one direction by MWG Biotech (Roissy CDG, France) yielded readable sequences of 800 bp on average. Because of possible sequence errors from PCR (28) or cloning (25), a conservative value of 97 % sequence-similarity was chosen for grouping into Operational Taxonomic Units (OTUs). Clone libraries were screened for chimeric

SAMPLE SOURCE :		60-m	70-m	90-m	Inter
<i>Eubacteria</i>	% Coverage	43	57	45	25
	H'	3.1	3.6	3.6	3.3
	D _{Mg}	6.9	10.0	10.3	7.8
	S _{Chao1}	48-153	67-152	100-269	52-155
<i>Archaea</i>	% Coverage	92	94	95	97
	H'	1.2	1.4	1.4	0.8
	D _{Mg}	1.6	1.4	1.4	0.8
	S _{Chao1}	6-12	6-20	6-14	4-4

Table 1: Properties of the distribution of phylotypes in clone libraries from the anoxic zone of Lake Pavin.
H': Shannon-Weiner index, DMg: Magalef index.

SAMPLE SOURCE	Sorensen similarity indices (%)			
	60-m	70-m	90-m	Inter
60-m		14.4 (73)	14.2 (91)	14.5 (89)
70-m			18.3 (67)	11.1 (80)
90-m				27.3 (80)

Table 2: Similarity matrix for the compositions of bacterial and archaeal sequences in samples collected at different depths in Lake Pavin. Values in parentheses are Sorensen index values for archaeal libraries and values without parentheses are those for bacterial libraries.

sequences with the Mallard program available at <http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft/> (4), and twenty three sequences identified as chimeras were excluded. The remaining 203 bacterial and 131 archaeal sequences were used in analyses.

Analyses of diversity and comparisons of libraries: Rarefaction curves were prepared with software available at <http://www.uga.edu/~strata/software.html>. Shannon-Weiner index (H' , 12), Sorensen similarity index (C_s , 21) and S_{chao1} (13) were computed using EstimateS software Version 7.5. (K. Colwell, <http://purl.oclc.org/estimates>). Coverage value (C) and Margalef index (D_{Mg}) were calculated as previously described (12, 23).

Rarefaction analyses showed that there was a broad diversity of *Bacteria* in samples, but less diversity of *Archaea* (Fig. S.1.a in the supplemental material). Coverage values for *Bacteria* in all four libraries were found to be low ($\leq 57\%$, Table 1). This, and results from rarefaction curves (Fig. S.1.b in the supplemental material), indicated that a greater number of clones would have provided more robust information on bacterial diversity within sites. Our data showed that bacterial diversity increased with depth (Table 1) in agreement with findings from a TRFLP study on Lake Pavin populations (17). Coverage values for *Archaea* were high ($\geq 92\%$, Table 1) at all 4 sites and rarefaction curves showed that asymptotes were almost reached (Fig. S.1.b in the supplemental material). The diversity indices for *Archaea* ranged from 0.8 to 1.4 for H' and 0.8 to 1.6 for D_{Mg} indicating low diversities at all sites (Table 1). The composition of *Archaea* did not vary greatly between sites ($\geq 67\%$), whereas Sorensen similarity indices of the bacterial phylotypes were low, ranging from 11.1 to 27.3 % (Table 2).

Phylogenetic analyses: Using the phylogenetic software package ARB (20), neighbour-joining trees were constructed and partial sequences from clone libraries inserted while retaining overall tree topology. The robustness of inferred topologies was tested by bootstrap analysis using PHYLIP (10) and 1000 re-samplings of trees. The sequences of the cloned inserts were deposited in GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). For accession numbers, see Fig. 2 and Figs. S.2.A-S.2.E in the supplemental material.

Unusual archaeal phylotypes were not detected excepted for one OTU at 70-m depth (Pav-Arc-010) affiliated with the phylum *Crenarchaeota* (Table S.1 in the supplemental material). The archaeal communities were dominated by sequences related to methanogens belonging to the *Methanosarcinales* and the *Methanomicrobiales* (Table S.1, Fig. 2). This finding is consistent with *in-situ* hybridization analyses in a previous study of Lake Pavin water samples (17). Lehours *et al.* (17) also noted that methane concentrations in the anoxic zone of Lake Pavin correlated with detection of methanogens belonging to the *Methanosarcinales*. In the present study, 71 % of methanogen sequences were related (> 95 %) to *Methanosaeta concilii* (Fig. 2). We postulate that acetoclastic methanogenesis is an important process in the anoxic zone of the water column in Lake Pavin.

Bacterial sequences were found to align with 16 of the 52 phylogenetic divisions (Table S.1). The majority of the 113 OTUs were most closely related to *Bacteria* or clone-library sequences associated with the *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* and Candidate division OP11 (Fig. 1). Because of the wide diversity, the inferred relatedness of bacterial OTUs was examined in 5 separate phylogenetic trees (Figs S.2.A to S.2.E). In the present study, many sequences were found to be only distantly related to cultivated organisms (Table S.1). Nevertheless, some sequences were sufficiently related to known bacteria to enable reasonable hypotheses on function to be formulated. At 60 m depth, three sequences were related (≥ 98.9 %) to sequences from known methylotrophs suggesting that some bacteria are involved in methane oxidation in the upper part of the chemocline. Three sequences (Pav-008) closely related (97.5 %) to the microaerophilic iron-oxidizing bacterium (FeOB), *Gallionella ferruginea* (11), were retrieved from the 60-m library. Because high concentrations of ferric and ferrous iron have been detected in the monimolimnion of Lake Pavin (17, 26), it is likely that FeOB are involved in recycling ferrous iron in the chemocline in Lake Pavin.

In the present study, bacterial sequences were dominated by sequences from the δ -*Proteobacteria* and a number of bacteria in this subdivision are known to reduce Fe (III) (7). Dissimilatory Fe (III) reduction appears to be a significant biological process in systems containing high concentrations of ferrous iron (19). Three sequences (Pav-087) were found to be related (94.4-94.6 %) to those of *Geothrix fermentans*, a Fe (III)-reducing bacterium isolated from a petroleum contaminated aquifer (18). A feature of our study was the finding that many sequences (at least 40 %) had their best matches with clone sequences obtained from contaminated sites and sediments (Table S.1). This included archaeal sequences closely related (97 %) to strains of *Methanosaeta concilii* recovered from hydrocarbon and chlorinated-solvent contaminated systems (Fig. 2). This apparent relationship was unexpected because Lake Pavin is a mountain lake in a

protected environment. We suggest that the link is ferric-iron reduction, a process often involved in detoxification processes (19).

Concluding remarks: Because of prolonged meromixis, the anoxic zone of Lake Pavin represents an unusual microbial ecosystem. The anoxic communities have evolved since the formation of Lake Pavin 6000 years ago and there has been little influence from external environment, except for the sedimentation fluxes. Only 30 % of the bacterial OTUs retrieved in this study were more similar than the 93 % genus proxy cutoff to sequences from isolated bacteria or published clone sequences. It appears that the microbial communities which inhabit the anoxic zone of Lake Pavin are rich in new types of bacteria. Culture-dependent studies will be necessary to reveal their ecological roles.

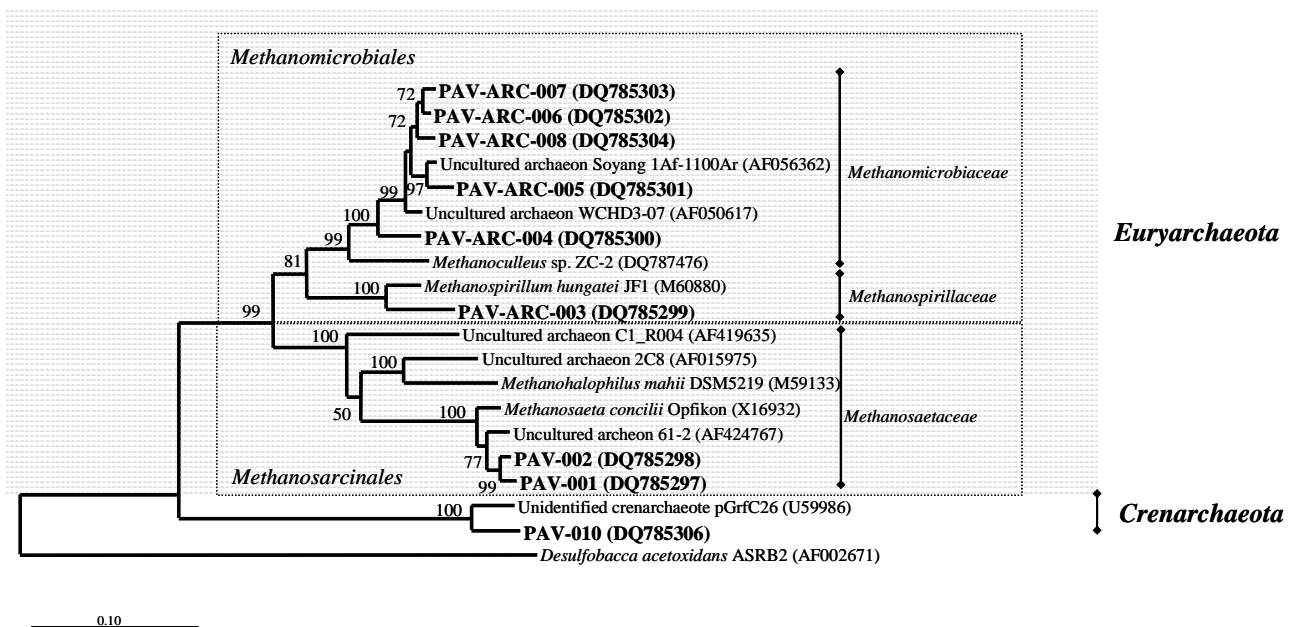
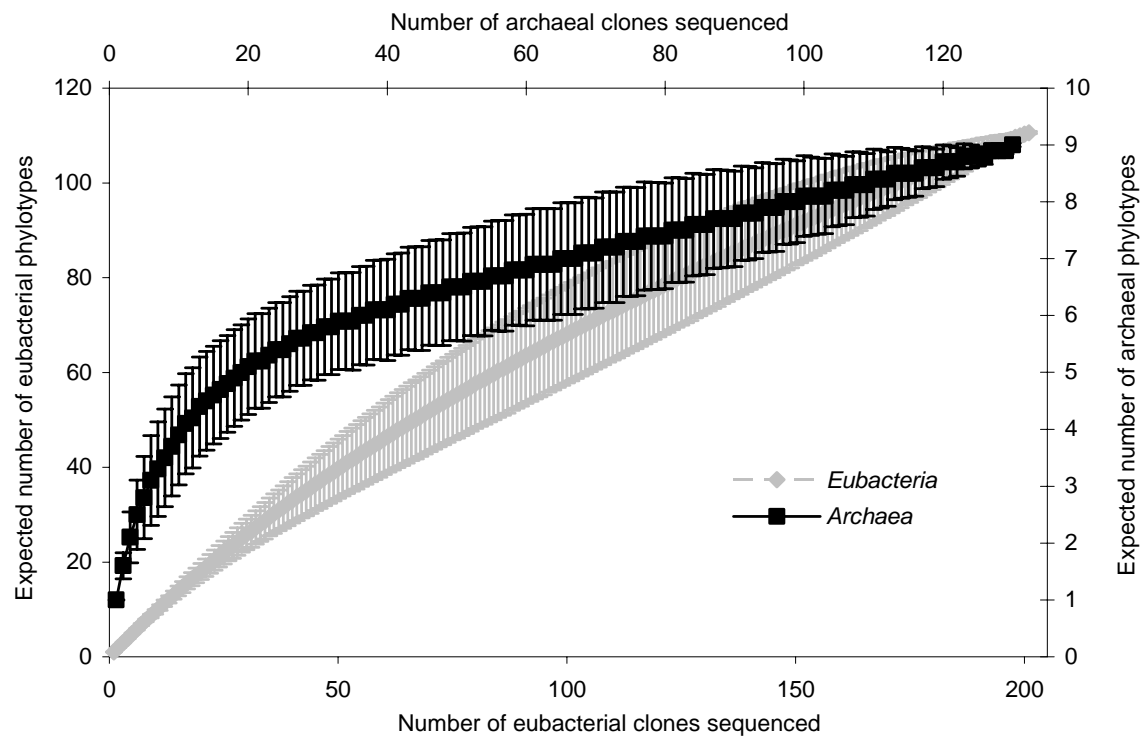
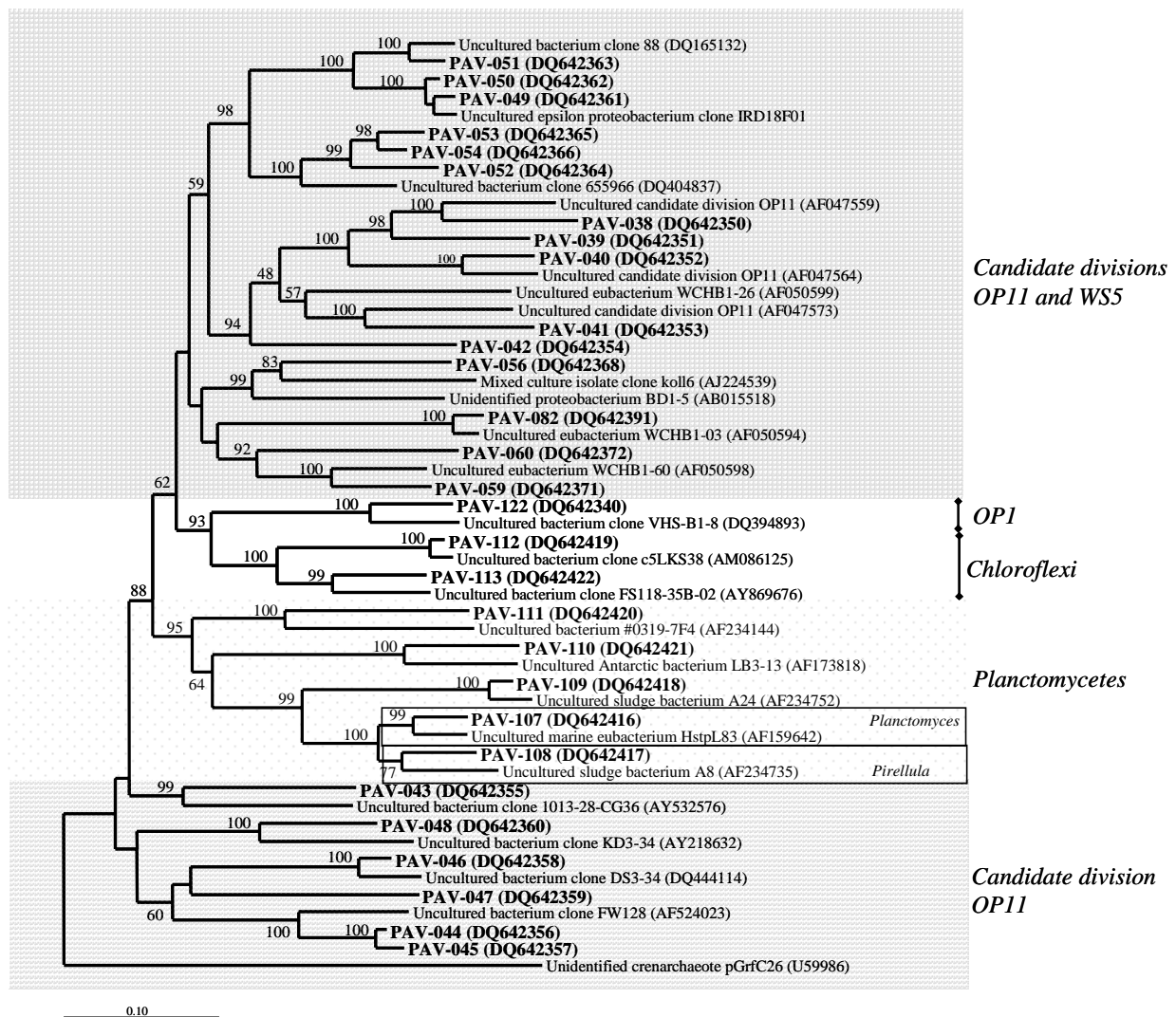


Figure 2: Neighbor-joining tree showing inferred phylogenetic relationships of 16S rRNA archaeal gene sequences cloned from the anoxic zone of Lake Pavin. Scale bars indicate Jukes-Cantor distances. Bootstrap values of >50 (for 1000 iterations) are shown. GenBank accession numbers are given in parentheses.



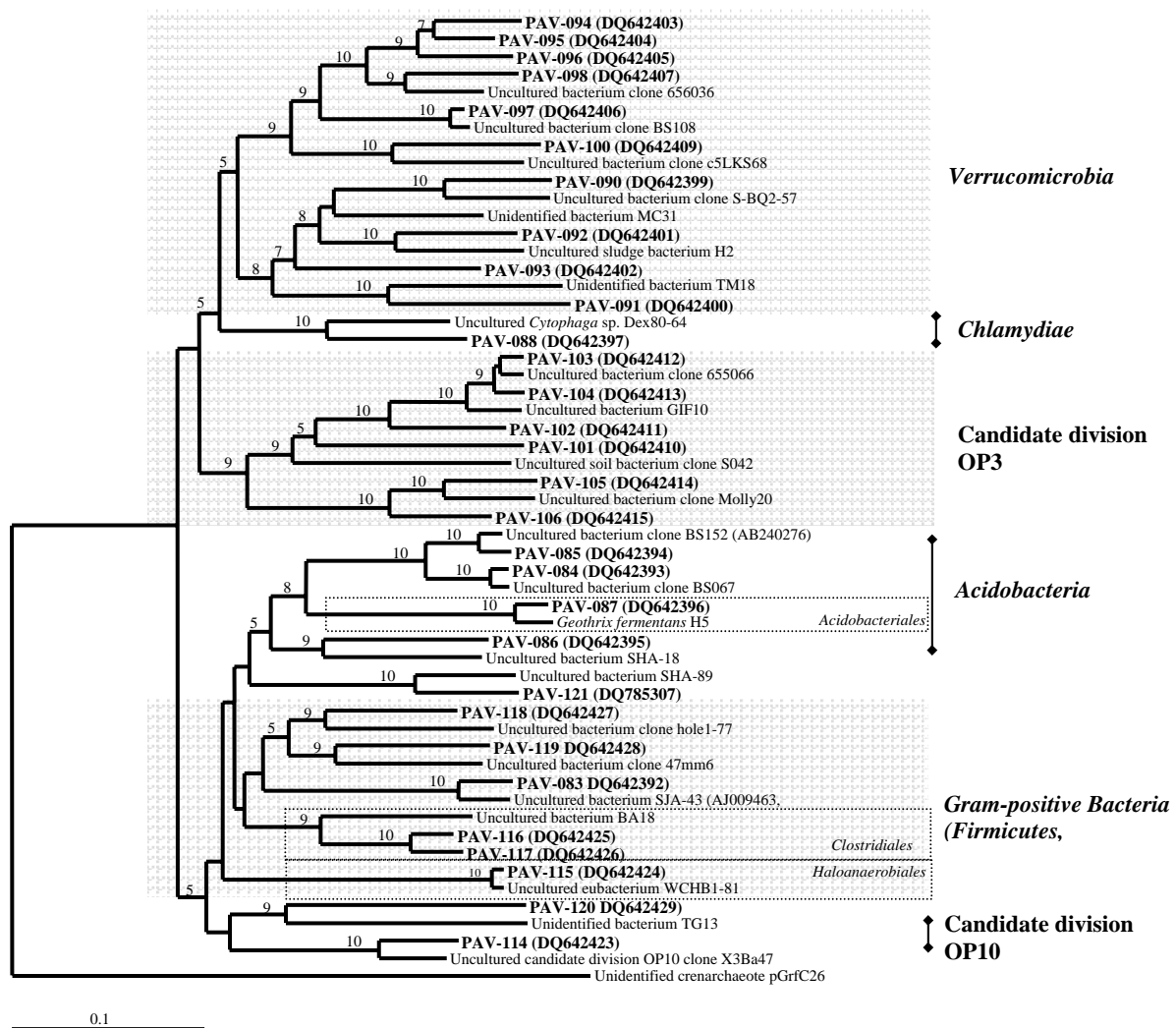
Figures S. 1: (a) Rarefaction curves of observed OTU richness in 4 bacterial and 4 archaeal libraries. Errors bars show 95% confidence limits. (b) Rarefaction curves generated for bacterial and archaeal 16S RNA gene sequences in clone libraries from samples collected at 60-m, 70-m, 90-m and Inter (92-m).

Figure S2.A



Figures S.2: Neighbor-joining trees showing inferred phylogenetic relationships of 16S rRNA bacterial gene sequences cloned from the anoxic zone of Lake Pavin. Scale bars indicate Jukes-Cantor distances. Bootstrap values of > 50 (for 1000 iterations) are shown. GenBank accession numbers are given in parentheses. Sequences affiliated to the phyla *Aminobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* and Candidates divisions OP11, OP1, WS5 are presented in Fig. S.2.A. Sequences affiliated to the phyla *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chlamidiae* and Candidate division OP3 are presented in Fig. S.2.B. Sequences affiliated to the δ -*Proteobacteria* subdivision are presented in Fig. S.2.C, sequences affiliated to other *Proteobacteria* are presented in Figure S.2.D, and Figure S.2.E contains sequences affiliated to the phyla *Bacteroidetes* and *Chlorobi*.

Figure S2.B



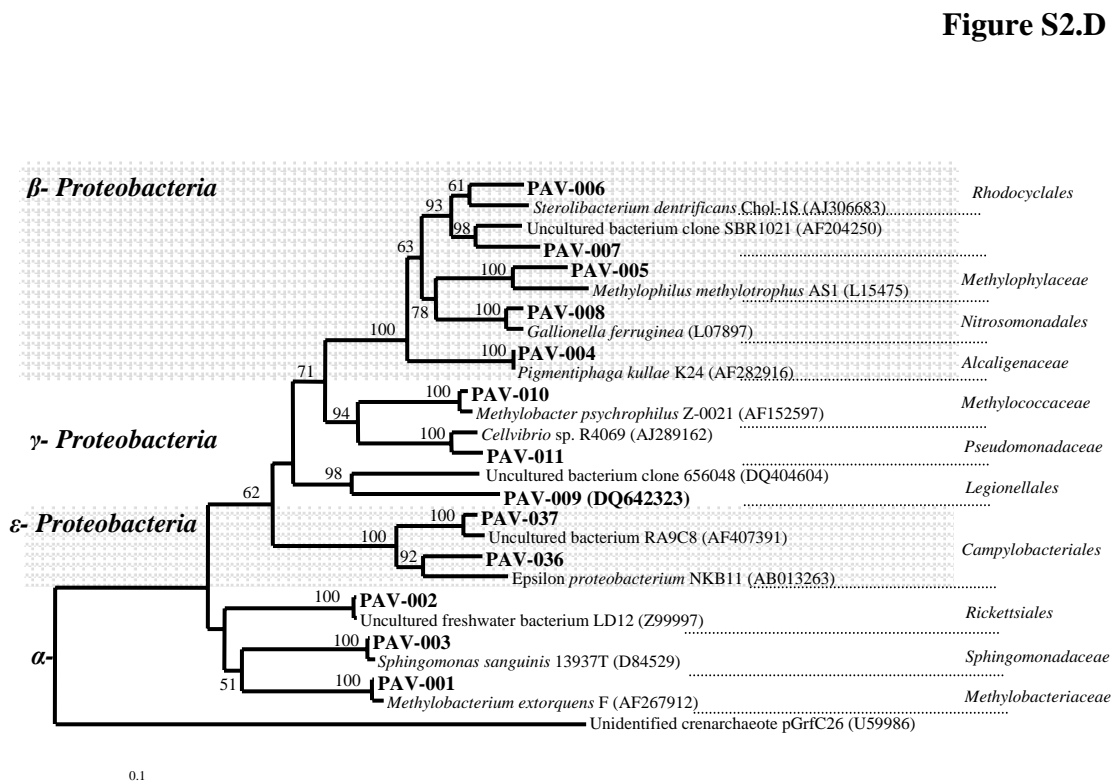
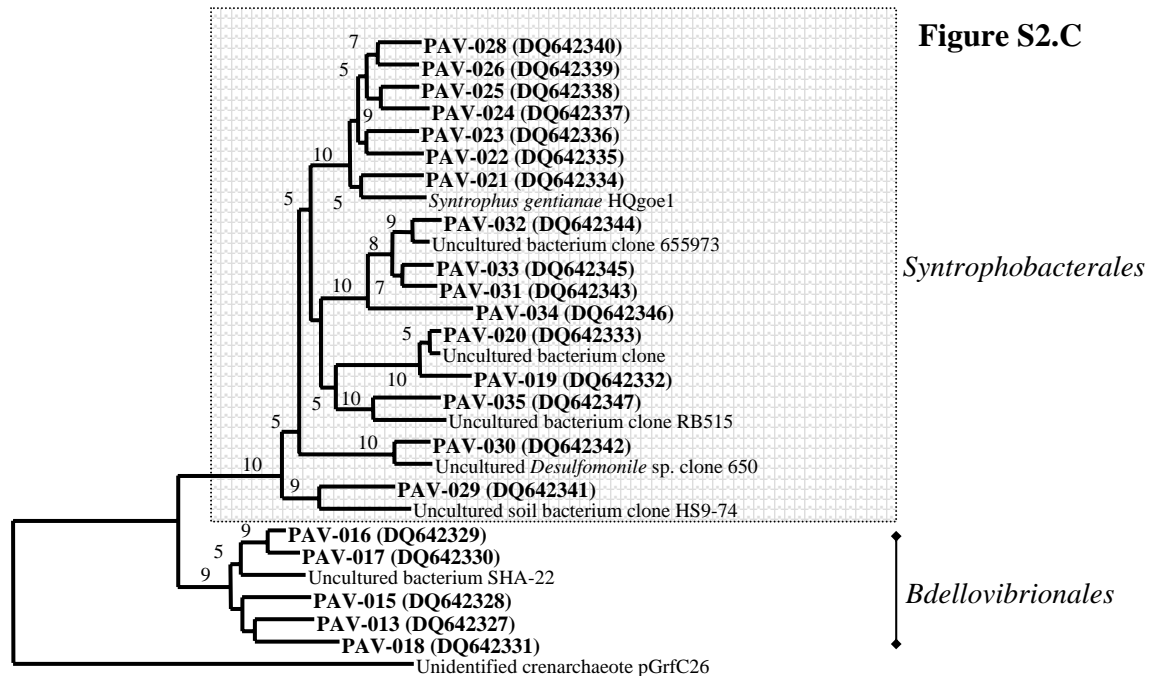
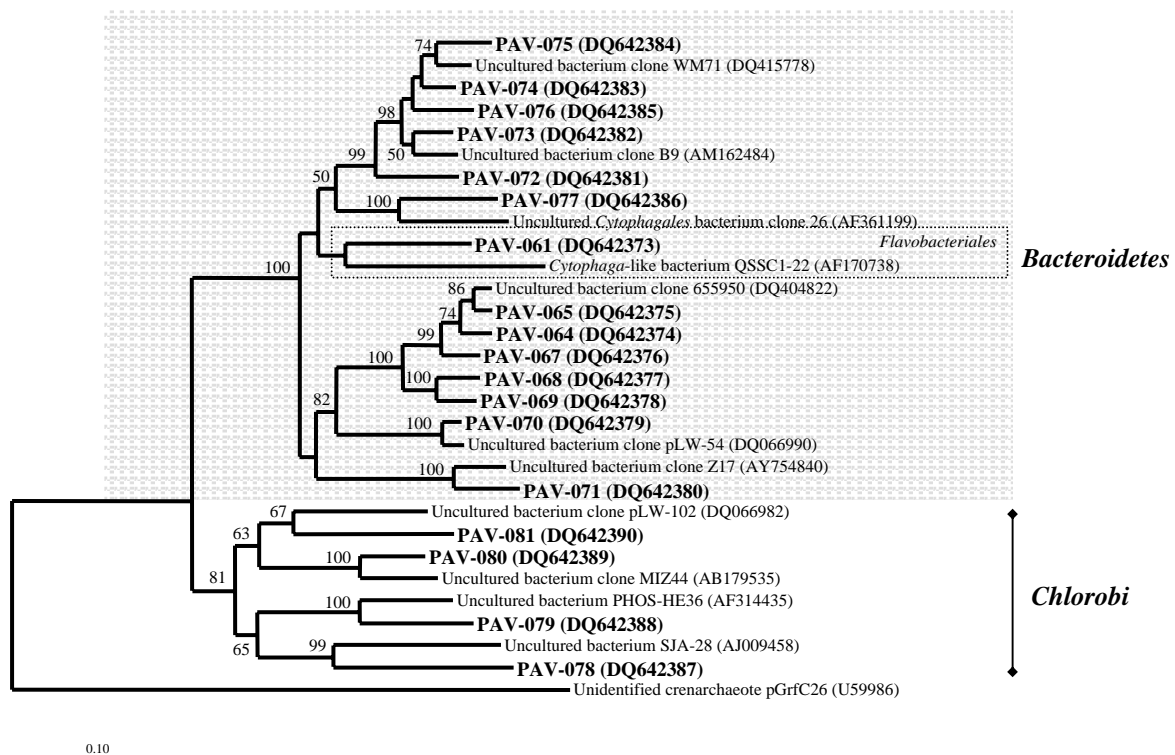


Figure S2.E



CHAPITRE II : DIVERSITE PHYLOGENETIQUE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES DE LA ZONE ANOXIQUE DU LAC PAVIN.

Phylogenetic affiliation	Representative clone	No. of clones in library				Taxon	Closest relative	% Identity	Accession No.
		60-m	70-m	90-m	Inter				
<i>α-Proteobacteria</i>	Pav001	1				<i>Methylobacterium extorquens</i>		99.3	AF267912
	Pav002				1	Uncultured freshwater bacterium clone LD12		99.9	Z99997
	Pav003	1				<i>Sphingomonas sanguinis</i> 13938T		99.6	D84529
<i>β-Proteobacteria</i>	Pav004		1			<i>Pigmentiphaga kullae</i> strain K24		100.0	AF282916
	Pav005	1		1		<i>Methylophilus methylotrophus</i>		92.8-93.7	L15475
	Pav006	1				<i>Sterolibacterium denitrificans</i> Chol-1S		93.4	AJ306683
	Pav007	1				Uncultured beta bacterium clone SBR1021		88.3	AF204250
	Pav008	4	1			<i>Gallionella ferruginea</i>		97.5-98.1	L07897
<i>γ-Proteobacteria</i>	Pav009				1	Uncultured bacterium clone 656048 *		87.6	DQ404604
	Pav010	1				<i>Methylobacter psychrophilus</i> Z-0021		98.9	AF152597
	Pav011			1		<i>Cellvibrio</i> sp. R4069		96.8	AJ289162
<i>δ-Proteobacteria</i>	Pav013			1	1	Uncultured bacterium SHA-22 **		89.9-90.1	AJ249102
	Pav015		1			Uncultured bacterium SHA-22 **		91.6	AJ249102
	Pav016		2	3		Uncultured bacterium SHA-22 **		91.3-92.7	AJ249102
	Pav017				1	Uncultured bacterium SHA-22 **		92.6	AJ249102
	Pav018			1		Uncultured bacterium SHA-22 **		92.8	AJ249102
	Pav019	2				Uncultured bacterium clone GOUTB20 ***		98.7-98.8	AY050605
	Pav020		1	1		Uncultured bacterium clone GOUTB20 ***		95.4-95.5	AY050605
	Pav021			3	2	<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		92.5-92.7	X85132
	Pav022		1			<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		93.5	X85132
	Pav023			1		<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		93.4	X85132
	Pav024			1	1	<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		91.1	X85132
	Pav025		4			<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		91.8-92.4	X85132
	Pav026		1	3	1	<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		91.5-92.1	X85132
	Pav028			1		<i>Syntrophus gentianaea</i> HQgoe1		92.1	X85132
	Pav029			1		Uncultured soil bacterium HS9-74 §		90.0	AY221614
	Pav030		3			Uncultured <i>Desulfomonile</i> sp.		95.6	AJ316023
	Pav031		2			Uncultured bacterium clone 655973 *		95.1-95.3	DQ404843
	Pav032		1			Uncultured bacterium clone 655973 *		97.3	DQ404843
	Pav033	1		1		Uncultured bacterium clone 655973 *		95.1-95.3	DQ404843
	Pav034	1				Uncultured bacterium clone 655973 *		90.9	DQ404843
	Pav035		1			Uncultured bacterium clone RB515		91.5	AB240382
<i>ε-Proteobacteria</i>	Pav036	6	3			<i>Epsilon-proteobacterium</i> clone NKB11		91.1-92.0	AB013263
	Pav037		2			Uncultured bacterium clone RA9C8 ***		98.0	AF407391
C. division OP11	Pav038		2			Candidate division OP11 clone NTd42		94.3-94.4	AF047559
	Pav039		1			Candidate division OP11 clone NTd42		81.9	AF047559
	Pav040	1		1		Candidate division OP11 clone LGd5		90.4-90.7	AF047564
	Pav041		1			Candidate division OP11 clone LGd14		80.3	AF047573
	Pav042		1			Uncultured bacterium clone WCHB1-26 §§§§		86.7	AF050599
	Pav043				1	Uncultured bacterium clone 1013-28-CG36 §§§		78.0	AY532576
	Pav044			1		Uncultured bacterium clone FW128 ****		87.6	AF524023
	Pav045			1		Uncultured bacterium clone FW128 ****		85.8	AF524023
	Pav046		1			Uncultured bacterium clone DS3-34		93.9	DQ444114
	Pav047		1			Uncultured bacterium clone DS3-34		71.3	DQ444114
	Pav048			1		Uncultured bacterium clone KD4-34		82.7	AY218632
	Pav049	1			1	Uncultured bacterium clone IRD18F01		97.0	AY947951
	Pav050		1			Uncultured bacterium clone IRD18F01		97.5	AY947951
	Pav051				1	Uncultured bacterium clone 88		94.9	DQ165132
	Pav052			1		Uncultured bacterium clone 655966 *		87.8	DQ404837
	Pav053		1			Uncultured bacterium clone 655966 *		87.6	DQ404837
	Pav054		1			Uncultured bacterium clone 655966 *		90.0	DQ404837
	Pav056			1		Mixed culture isolate Koll 6		76.9	AJ24539
C. division WS5	Pav059				1	Uncultured <i>Eubacterium</i> clone WCHB1-60 §§§§		88.3	AF050598
	Pav060		1			Uncultured <i>Eubacterium</i> clone WCHB1-60 §§§§		77.8	AF050598
<i>Bacteroidetes</i>	Pav061				1	<i>Cytophaga</i> -like bacterium QSSC1-22		82.5	AF170738
	Pav064		1	6		Uncultured bacterium clone 655950 *		94.3-96.8	DQ404822
	Pav065			1	1	Uncultured bacterium clone 655950 *		97.4-98.1	DQ404822
	Pav067	1				Uncultured bacterium clone 655950 *		96.9	DQ404822
	Pav068	2	1			Uncultured bacterium clone 655950 *		90.5-90.9	DQ404822
	Pav069		1			Uncultured bacterium clone 655950 *		91.2	DQ404822
	Pav070		6	2	1	Uncultured bacterium clone pLW-54		97.2-97.8	DQ066990
	Pav071			1	1	Uncultured bacterium clone Z17		93.6	AY754840
	Pav072	1				Uncultured bacterium clone B9 *§§		91.0	AF323778
	Pav073			1		Uncultured bacterium clone B9 *§§		95.4	AF323779
	Pav074			1		Uncultured bacterium clone WM71		95.3	DQ415778
	Pav075	2				Uncultured bacterium clone WM71		94.6-95.0	DQ415778
Chlorobi	Pav076		1			Uncultured bacterium clone BA069 *§§		95.0	AF323779
	Pav077		3		1	Uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium clone 26		88.4	AF361199
	Pav078	1				Uncultured bacterium clone SJA-28 **§		83.2	AJ009458
	Pav079				1	Uncultured bacterium clone PHOS-HE36		88.9	AF314435
	Pav080			1		Uncultured bacterium clone MIZ44		92.2	AB179535
	Pav081			1		Uncultured bacterium clone pLW-102		84.3	DQ066982
	Pav082		1	1		Uncultured bacterium clone WCBH1-03		96.4-97.7	AF050594
	Pav083			1		Uncultured bacterium SJA-43 **§		95.4	AJ009463
<i>Actinobacteria</i>	Pav084		1			Uncultured bacterium clone BS067		98.1	AB240247
	Pav085				1	Uncultured bacterium clone BS152		97.2	AB240276
	Pav086			1		Uncultured bacterium SHA-18 **		83.6	AJ249099
	Pav087			2	1	<i>Geothrix fermentans</i>		94.2-96.4	U41563
<i>Chlamydiae</i>	Pav088		1			Uncultured <i>Cytophaga</i> sp. Clone Dex 80-64		87.5	AJ431235

Continued on following page

Table S.1 Continued

Phylogenetic affiliation	Representative clone	No. of clones in library				Taxon	Closest relative	% Identity	Accession No.
		60-m	70-m	90-m	Inter				
<i>Verrucomicrobia</i>	Pav090	1				Uncultured bacterium clone S-BQ2-57		89.8	DQ017935
	Pav091				1	Uncultured bacterium clone TM18		81.5	X97110
	Pav092		2			Uncultured sludge bacterium clone H ₂		87.1-87.6	AF234711
	Pav093			1		Unidentified bacterium clone MC31		81.0	X64380
	Pav094			3		Uncultured bacterium clone 656036 *		87.9-88.0	DQ404592
	Pav095				1	Uncultured bacterium clone 656036 *		89.5	DQ404592
	Pav096	1	3	5	2	Uncultured bacterium clone 656036 *		87.1-88.4	DQ404592
	Pav097		1			Uncultured bacterium clone BS108		98.1	AB240261
	Pav098			2		Uncultured bacterium clone 656036 *		90.5-90.7	DQ404592
	Pav099				1	<i>Eubacterium</i> WCBH1-41 §§§§		81.4	AF050560
C. division OP3	Pav100	1	1	2		Uncultured bacterium clone c5LKS68		86.5-86.9	AM086141
	Pav101		1			Uncultured soil bacterium clone S042		80.8	AF507707
	Pav102		1			Uncultured bacterium clone GIF10		88.0	AF407201
	Pav103		1			Uncultured bacterium clone 655066 *		97.2	DQ404728
	Pav104		2			Uncultured bacterium clone 655066 *		97.4-97.6	DQ404728
	Pav105			1		Uncultured bacterium clone Molly20PossVerruco		92.1	AY775495
	Pav106		3			Uncultured bacterium clone Molly20PossVerruco		89.4	AY775495
<i>Planctomycetes</i>	Pav107	1				Uncultured bacterium clone HstpL83		93.1	AF159642
	Pav108		1			Uncultured sludge bacterium clone A8		89.3	AF234735
	Pav109			1		Uncultured sludge bacterium clone A24		95.9	AF234752
	Pav110			1		Uncultured antarctic bacterium clone LB3-13		85.5	AF173818
	Pav111			1		Uncultured bacterium clone # 0319-7F4		76.6	AF234144
Chloroflexi	Pav112			1	1	Uncultured bacterium clone c5LKS38		97.6	AM086125
	Pav113				2	Uncultured bacterium clone FS118-35B-02		87.6-88.2	AY869676
C. division OP10	Pav114				1	Uncultured candidate division OP10 X3Ba47		92.8	AY607137
Firmicutes	Pav115	1			1	Uncultured <i>Eubacterium</i> WCBH1-81 §§§§		98.7-98.8	AF050572
	Pav116	1				Uncultured bacterium clone BA18		87.5	AF129861
	Pav117				2	Uncultured bacterium clone BA18		83.7-85.8	AF129861
	Pav118	1				Uncultured bacterium clone holel-77		86.0	DQ088758
	Pav119			1		Uncultured bacterium clone 47 mm6		86.0	AY796046
<i>Coprothermobacter</i>	Pav120	1			1	Uncultured bacterium clone TG13		78.7-79.2	AB004575
	Pav121		1			Uncultured bacterium clone SHA-89 **		89.2	AJ249097
C. division OP1	Pav122		2			Uncultured bacterium clone VHS-B1-8		88.5-89.0	DQ394893
<i>Euryarchaeota</i>	Pav-Arc-001	15	16	14	28	<i>Methanosaeta concilii</i> Opfikon		95.8-96.4	X16932
	Pav-Arc-002	3		15		<i>Methanosaeta concilii</i> Opfikon		96.4-97.1	X16932
	Pav-Arc-003			1		<i>Methanospirillum hungatei</i> JF1		95.2	M60880
	Pav-Arc-004	1	5	1	1	Uncultured archaeon clone Soyang 1Af-1100 Ar		93.6-94.4	AF056362
	Pav-Arc-005	1				Uncultured archaeon clone Soyang 1Af-1100 Ar		97.8	AF056362
	Pav-Arc-006	2	4	2	2	Uncultured archaeon clone Soyang 1Af-1100 Ar		97.1-97.5	AF056362
	Pav-Arc-007		1			Uncultured archaeon clone Soyang 1Af-1100 Ar		96.9	AF056362
	Pav-Arc-008	2	5	5	6	Uncultured archaeon clone Soyang 1Af-1100 Ar		96.8-97.4	AF056362
<i>Crenarchaeota</i>	Pav-Arc-010		1			Uncultured crenarchaeote clone pGrfC26		95.5	U59986

Table S.1: Bacterial and archaeal 16S rRNA gene sequences identified in clone libraries from the anoxic water column of the Lake Pavin together with best-match identities derived from database sequences with ≥ 93 % similarity levels. The closest relatives in contaminated systems are identified by the following: (*) heavy metals (Abulencia *et al.* 2006); (**) 1-2 dichloropropane (Schlötterburg *et al.* 2000); (***) monochlorobenzene (Alfreider *et al.* 2002); (****) coal (Brofft *et al.* 2002); (§) hydrocarbons (Joynt *et al.* 2006); (§§§) uranium; (§§§§) hydrocarbon-and chlorinated solvents (Dojka *et al.* 1998); (*§§) benzoate; (*§) trichlorobenzene (von Wintzingerode *et al.* 1999).

We gratefully acknowledge the French Embassy in New Zealand, the New Zealand Ministry for Research Science and Technology, and the French Ministry for Foreign Affairs for financial support for scientist exchanges (G F, KJ and A-C L). We thank J. C. Romagoux and G. Demeure for their skilled technical assistance.

REFERENCES

1. Abulencia, C. B., D. L. Wyborski, J. A. Garcia, M. Podar, W. Chen, S. H. Chang, H. W. Chang, D. Watson, E. L. Brodie, T. C. Hazen, and M. Keller. 2006. Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3291-3301.
2. Aeschbag-Hertig, W., M. Hofer, R. Kipfer, D. M. Imboden, and R. Wieler. 1999. Accumulation of mantle gas in a permanently stratified volcanic lake (Lac Pavin, France). *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**:3357-3372.
3. Alfreider, A., C. Vogt, and W. Babel. 2002. Microbial diversity in an *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:232-240.
4. Aschelford, K. E., N. A. Chuzhanova, J. C. Fry, A. J. Jones, and A. J. Weightman. 2006. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5734-5741.
5. Béjā, O., E. V. Koonin, L. Aravind, L. T. Taylor, H. Seitz, J. L. Stein, D. C. Bensen, R. A. Feldman, R. V. Swanson, and E. F. DeLong. 2002. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:335-345.
6. Brofft, J. E., J. V. McArthur, and L. J. Shimkets. 2002. Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. *Environ. Microbiol.* **4**:764-769.
7. Coleman, M. L., D. B. Hedrick, D. R. Lovley, D. C. White, and K. Pye. 1993. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* **361**:436-438.
8. Cottrell, M; T., and D. L. Kirchman. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5116-5122.
9. Dojka, M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack, and N. R. Pace. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3869-3877.

- 10.Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- 11.Hanert, H., H.** 1991. The genus *Gallionella*, p. 4082-4088. In A. Ballows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. 4. Springer-Verlag, New York, N. Y.
- 12.Hill, A. C. J., K. A. Walsh, J. A. Harris, and B. F. Moffett.** 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:1-11.
- 13.Hughes, J., B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. M. Bohannan.** 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4399-4406.
- 14.Humayoun, S. B., N. Bano, and J. T. Hollibaugh.** 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono lake, a meromictic soda lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030-1042.
- 15.Jardillier, L., M. Basset, I. Domaizon, A. Belan, C. Amblard, M. Richardot, and D. Debroas.** 2004. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aqua. Microb. Ecol.* **35**:259-273.
- 16.Joynt, J., M. Bischoff, R. Turco, A. Konopka.** 2006. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. *Microb. Ecol.* **51**:209-219.
- 17.Lehours, A-C., C. Bardot, A. Thénot, D. Debroas, and G. Fonty.** 2005. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin: a unique meromictic lake. *Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. Appl. Environ. Microbiol.* **71** :7382-7400.
- 18.Lonergan, D. J., H. L. Jenter, J. D. Coates, E. J. P. Phillips, T. M. Schmidt, and D. R. Lovley.** 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe (III)-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:2402-2408.
- 19.Lovley, D. R.** 2003. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reducing prokaryotes. "The Prokaryotes": <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/419/COMPLETE.htm>.
- 20.Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, et al.** 2004. ARB:a software environment for sequence data. *Nucleic Acid. Res.* **32**:1363-1371.
- 21.Magurran, A. E.** 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, Princeton, N. J.
- 22.Mallet, C., and D. Debroas.** 2000. Regulation of aminopeptidase activity in the sediment of a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **149**:327-335.
- 23.Mullins, T. D., T. B. Britschgi, R. L. Krest, and S. J. Giovannoni.** 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* **40**:148-158.
- 24.Schlötterburg, C., F. Von Wintzingerode, R. Hauck, W. Hegemann, and U. B. Göbel.** 2000. Bacteria of an anaerobic 1,2-dichloropropane-dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1505-1511.

- 25. Speksnijder, A. G. C. L., G. A. Kowalchuck, S. De Jong, E. Kline, J. R. Stephen, and H. J. Laanbroek.** 2001. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:469-472.
- 26. Viollier, E., G. Michard, D. Jézéquel, M. Pèpe, and G. Sarazin.** 1997. Geochemical study of a crater lake : Lake Pavin, Puy de Dôme, France. Constraints afforded by the particulate matter distribution in the element cycling within the lake. *Chem. Geol.* **142**:225-241.
- 27. Von Wintzingerode, F., B. Selent, W. Hegemann, and U. B. Göbel.** 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:283-286.
- 28. Von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, and E. Staeckebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.

IV. DISCUSSION GENERALE

Aborder la diversité phylogénétique des communautés microbiennes anaérobies de la zone anoxique du Lac Pavin s'avérait être une démarche essentielle. Si le premier objectif se révélait très anthropocentrique et avait pour but d'"identifier" les communautés de cet écosystème très particulier, ce travail s'inscrit également dans la continuité des démarches qui visent à accroître les connaissances sur la biodiversité microbienne. Ces études doivent en effet être largement poursuivies, particulièrement dans des environnements présentant un fort particularisme, afin d'étendre encore (ou peut-être !) les limites des deux domaines procaryotiques.

A l'issu de cette étude, les résultats obtenus soulèvent néanmoins de nombreuses questions additionnelles. Un certain nombre d'hypothèses ont été proposées dans la discussion de l'article précédent, et ne sera discuté dans cette section que certaines observations particulières. Ces dernières et leur domaine d'implication peuvent être schématiquement répertoriés comme suit :

IMPLICATIONS ECOLOGIQUES ?

- Les séquences ADN_r16S représentatives des communautés bactériennes anaérobies du Lac Pavin présentent des divergences très marquées avec les séquences issues de bactéries en culture ou de clones environnementaux (70% appartiennent à des groupes taxonomiques divergents au niveau de l'ordre). Une forte dissimilarité est également observée entre les différentes librairies d'*Eubacteria* (<27% similarité).
- Par opposition, les *Archaea* sont étroitement affiliées à des séquences issues de différents environnements anaérobies (>95% pour les *Euryarchaeota*) et les librairies construites à partir de différentes profondeurs sont fortement similaires (>62%).

IMPLICATIONS METABOLIQUES ET FONCTIONNELLES ?

- Aucune séquence affiliée aux groupes archéens ANME-1 ou ANME-2 (impliqués dans la réoxydation anaérobie du méthane dans les environnements marins) n'a été révélée.
- Pas d'affiliation de séquences ARN_r16S à des familles de bactéries déjà isolées réalisant la réduction dissimilatrice du fer (ex : *Geobacteriaceae*, *Shewanella*, etc.).

I.A. Implications écologiques

Les premières études conduites sur le Lac Pavin (Article 1) et le Lac d'Aydat (Article 2) avaient mis en relief une forte dissimilarité (sur la base des profils TRFLP) de la composition taxonomique des communautés bactériennes de leurs strates anoxiques (*cf.* Discussion chapitre I). L'hypothèse émise était que les caractéristiques propres à chacun de ces lacs, notamment le dynamisme opposé (stabilité *versus* déstructuration) de leurs colonnes d'eau, contraignaient des adaptations divergentes et donc une composition taxonomique différente. Cependant, la grande majorité (70%) des espèces bactériennes de la strate anoxique du Lac Pavin, représentées par leurs séquences ARNr16S, montrent également une forte distance phylogénétique avec des espèces présentes dans des écosystèmes plus similaires (exemple : zone anoxique de lacs méromictiques ou sédiments lacustres) ou dans d'autres environnements anoxiques.

Ainsi, le concept du "*Tout est partout*" (**Beijenrick 1913**) n'apparaît pas se vérifier dans la strate anoxique du Lac Pavin. Ceci pourrait conduire à considérer que cette zone constitue une barrière "infranchissable", caractérisée par des espèces et des assemblages bactériens spécifiques et inféodés à ce monimolimnion, au même titre que dans certains milieux extrêmes (comme les sources chaudes, les sources hydrothermales, *etc.*). Si cette assertion est relativement ambitieuse (et spéculative !), elle est néanmoins en accord avec le particularisme de la strate anoxique dont le confinement relatif a probablement conduit à des processus de spéciation bactérienne (diversification) (**Martiny et al. 2006**)

Au sein même de ce lac, une forte dissimilarité de la composition des populations bactériennes des quatre profondeurs échantillonnées a été notée (<27% de similarité). Cette stratification a également été observée dans l'étude menée sur la diversité et la distribution spatiale des communautés microbiennes anaérobies du monimolimnion du Lac Pavin (Article 1). **Lindstrom et Leskinen (2002)** ont mis en évidence que les interactions biologiques, et/ ou les conditions physico-chimiques au sein d'un même lac peuvent être plus importantes pour le déterminisme de la composition de la communauté bactérienne que la situation géographique du lac. Ainsi, le fort gradient physico-chimique de la zone anoxique du Lac Pavin ainsi que le vaste réseau d'interactions qu'établissent entre eux les procaryotes anaérobies pourraient être les facteurs explicatifs de la dissimilarité marquée entre la composition microbienne des différentes strates.

A partir de ces hypothèses, comment dès lors interpréter la "faible" diversité des *Archaea*, leurs affiliations fines avec des espèces ou des clones environnementaux, et la forte similarité de la composition taxonomique archéenne observée entre les différentes strates échantillonnées ?

Afin de proposer certains facteurs explicatifs, nous nous appuyerons sur des observations réalisées en bio-réacteurs anaérobies. **Fernandez et ses collaborateurs (2000)** ont révélé que les communautés bactériennes des réacteurs anaérobies n'étaient pas reproductibles ; observations également réalisées dans une variété de systèmes anaérobies (**Pender et al. 2004, Collins et al. 2003**). Si cette variabilité est attribuée à un processus de dynamique chaotique (**Curtis et Sloan 2004**), ce comportement dynamique n'est pas observé, dans ces mêmes systèmes, pour les communautés d'*Archaea*. Ainsi l'analyse de la diversité des *Euryarchaeota* au sein de différents réacteurs anaérobies a révélé une composition similaire des communautés de méthanogènes (**Fernandez et al. 2000, Pender et al. 2004, Leclerc et al. 2001 et Zumstein et al. 2000**). L'étude conduite par **Leclerc et al. (2004)** sur 44 digesteurs anaérobies localisés dans 8 pays différents et traitant des effluents issus d'activités anthropiques variées (agriculture, pétrochimie, agro-alimentaire) a également mis en évidence une forte similarité des communautés de méthanogènes au sein de ces différents digesteurs adaptés à différentes sources de carbone.

Ces écosystèmes sont certes relativement éloignés des caractéristiques de la zone anoxique du Lac Pavin, cependant les hypothèses formulées par **Curtis et Sloan (2003)** à la suite de ces travaux peuvent être intéressantes dans le cadre du Lac Pavin. Ces auteurs ont postulé que la reproductibilité et la stabilité des *Euryarchaeota* dans ces réacteurs anaérobies est la résultante d'une faible diversité de la métacommunauté d'origine. D'autre part, la fréquence de l'occurrence d'un même organisme dans une variété de systèmes différents peut suggérer que cet organisme était largement représenté dans la métacommunauté. L'alternative déterministe est que ces organismes sont de "super généralistes" pouvant être compétitif dans plusieurs systèmes (ou plusieurs strates dans le cas du Lac Pavin).

Une hypothèse également probable est liée à la pyramide des énergies. Dans le lac Pavin, les communautés d'*Archaea* sont essentiellement représentées par les méthanogènes. Ces dernières intervenant dans les étapes terminales de la dégradation de la MO présentent des potentialités énergétiques moindres en regard de leurs compétitrices directes (BSR, ferro-réductrices). Il est ainsi possible que le nombre de substrats disponibles pour la méthanogénèse soit limité et contraigne une très forte spécialisation métabolique limitant l'extension de ce groupe.

I.B. Implications métaboliques et fonctionnelles

Les données physico- et géo- chimiques (profils de CH₄, Fe(III), Fe(II), H₂S, SO₄²⁻, traçage isotopique du carbone cf. Présentation des sites d'études) ainsi que la co-occurrence de communautés d'*Archaea* méthanogènes et de bactéries sulfato-réductrices dans le monimolimnion

du Lac Pavin (*cf.* Article 1) nous avaient conduits à formuler deux hypothèses sur des métabolismes microbiens putatifs :

- Implication potentielle de bactéries dans le processus de réduction dissimilatrice du Fe(III)
- Existence d'un processus de réoxydation anaérobie du CH₄ (éventuellement couplé à la réduction du Fe (III))

L'analyse phylogénétique des communautés anaérobies du Lac Pavin, n'a pas révélé de séquences d'*Eubacteria* (à l'exception de *Geothrix fermentans*) finement affiliées à des familles de ferro-réductrices obligatoires actuellement connues (**Lonergan et al. 1996**). D'autre part aucune séquence archéenne n'est apparentée aux groupes méthanotrophes anaérobies ANME-1 et ANME-2 mis en évidence dans les environnements marins (**Orphan et al. 2001**).

La question pouvant légitimement se poser est donc : *Ces observations invalident-elles nos hypothèses précédentes relatives à l'oxydation anaérobie du méthane et à son couplage avec des bactéries réductrices du Fe(III) ?*

Les études conduites sur les bactéries réalisant la réduction dissimilatrice du Fe (III) ont essentiellement été focalisées sur un petit nombre de modèles en culture pure [ex : *Geobacter metallireducens*, *Desulforomonas acetoxidans*, *D. Palmitis*, *Pelobacter carbonicus*, etc., (*cf.* Revue bibliographique)], et affiliés pour leur grande majorité à la sub-division δ -*Proteobacteria*. Cependant, de nombreux autres microorganismes présentent cette potentialité métabolique (**Lonergan et al. 1996**, **Lovley et al. 2003**). **Lonergan et al. (1996)** soulignent également que les microorganismes responsables de la réduction du Fe(III) dans les environnements naturels n'ont pas encore été identifiés car la majorité des Fe(III)-réductrices ont été déterminées *via* des "criblage" de collections en culture. Ainsi, si la distance phylogénétique entre les séquences ARNr16S des bactéries anaérobies du Lac Pavin et celles de microorganismes isolés ne permet pas de spéculer sur des activités métaboliques putatives, elle n'implique cependant pas que certains microorganismes, non identifiés, ne puissent réaliser la réduction dissimilatrice du Fe(III). D'autre part, ce processus n'est pas l'apanage de ferro-réductrices obligatoires (**Lovley et al. 2003**). Ainsi, certaines espèces sulfato-réductrices ou fermentatives (*Cf. Partie III Revue Bibliographique*) sont capables d'utiliser cette voie comme processus métabolique alternatif (**Lovley et al. 2003**).

Les études conduites dans les écosystèmes sédimentaires marins ont révélé que les *Archaea* méthanotrophes anaérobies étaient affiliées aux groupes ANME-1 et ANME-2. Doit-on pour autant considérer que cette propriété est strictement l'apanage de ces deux clades

phylogénétiques ? L'histoire même de la découverte du processus de réoxydation anaérobie du méthane (*Cf.* Revue bibliographique), qui a longtemps soulevé un fort scepticisme de la communauté scientifique, révèle le "danger" des dogmes. Si l'étude expérimentale de la combinaison de deux processus connus est probablement plus évidente que la recherche d'un processus nouveau (**Strous et Jetten 2004**), il n'est cependant pas exclu qu'une espèce unique puisse réaliser la méthanotrophie anaérobie. **Strous et Jetten (2004)** postulent également que de nouvelles découvertes inspirées du processus OAM, comme la possibilité d'un couplage AMO et Fe(III) ou NO_3^- , puissent aboutir dans l'avenir.

Les communautés microbiennes anaérobies du Lac Pavin, présentent, comme nous l'avions supposé une grande originalité. Outre les aspects discutés précédemment, cette étude révèle également que nombres de séquences sont affiliées à des Divisions Candidates (jusqu'à 30% des séquences), notamment le phylum OP11. Si cette observation est extrêmement intéressante (et stimulante pour les essais d'isolement en culture !), elle renforce néanmoins le "mystère" sur ces communautés anaérobies, notamment sur leurs potentialités métaboliques.

CHAPITRE III

Etudes de métabolismes anaérobies
de la zone anoxique du lac Pavin

-Réduction dissimilatrice du Fe (III) et Acétogénèse-



CHAPITRE III: ETUDES DE METABOLISMES MICROBIENS ANAEROBIES DE LA ZONE ANOXIQUE DU LAC PAVIN: APPROCHES CULTURALES

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Lorsque l'étude des microorganismes de la strate anoxique du Lac Pavin a débuté, une approche culture dépendante s'est rapidement imposée comme une démarche essentielle pour la caractérisation phénotypique des communautés anaérobies inféodées à cette zone. Cette nécessité a également été renforcée par les résultats acquis *via* les approches d'écologie moléculaire (Article 3). Les objectifs de ces études culturelles étaient multiples : outre la volonté de mettre en évidence des fonctions métaboliques potentiellement importantes au sein du réseau trophique anaérobie du Lac Pavin, elles avaient également pour but l'isolement, l'identification et la caractérisation de microorganismes issus de cette zone profonde afin de développer des modèles d'études *in vitro*.

I.A. Mise en évidence, par méthodes culturelles, de métabolismes microbiens dans le monimolimnion du Lac Pavin -Contraintes et limites des études- .

Si l'accès aux informations phénotypiques des microorganismes anaérobies du Lac Pavin revêtait un intérêt évident, un certain nombre d'obstacles majeurs ont néanmoins contraint ce travail.

I.A.1. Mise en place de procédures culturelles anaérobies et développement de stratégies culturelles adaptées.

Ce travail constitue la première étude, au sein du Laboratoire de Biologie des Protistes, de communautés anaérobies *via* des approches culturelles. Ainsi, outre les aspects techniques spécifiques à la culture en anaérobiose qui n'étaient pas préalablement développés dans ce laboratoire, la mise en place de stratégies culturelles adaptées aux communautés ciblées a été nécessaire. En effet, les premières tentatives d'enrichissement réalisées *via* des milieux anaérobies classiquement définis dans la littérature, ciblant des fonctions microbiennes comme la méthanogénèse et la sulfato-réduction qui apparaissent probablement réalisées dans la strate anoxique du Lac Pavin, n'ont pas permis d'observer de croissances microbiennes significatives. Il est ainsi apparu que la caractérisation phénotypique des microorganismes de cette zone anoxique s'avérerait être un défi particulier. Notre stratégie générale s'est orientée vers le développement d'une large gamme de conditions de culture incluant des milieux synthétiques ou semi-synthétiques dont les compositions minérales sont présentées en **Annexes (2-3, 5)**. L'importance de développer des conditions culturelles aussi proches que possible des conditions environnementales a été évoquée dans le cadre de la revue bibliographique. Aussi, afin

d'optimiser les conditions de culture, des milieux "simulant l'habitat naturel" (SHN) ont également été réalisés (**Annexe 4**). Des combinaisons de donneurs (acétate, formiate, fumarate, lactate, H_2 , *etc.*) et d'accepteurs d'électrons (SO_4^{2-} , NO_3^- , Fe(III), Mn(IV), CO_2) ont été secondairement supplémentées à ces compositions minérales "de base". Ainsi, plus de 200 conditions de culture différentes ont été réalisées (**Annexe 8**). Ces dernières ont étéensemencées avec des inocula provenant de 5 strates de la zone anoxique du Lac Pavin (60-m, 70-m, 90-m, Interface eau/sédiment, couche sédimentaire superficielle (0-2 cm)).

I.A.2. Compatibilité entre les durées d'incubations et les études ciblées et finalisées.

Aux prémices de ces études, de nombreuses interrogations rendaient complexes des études systématiques ciblées. "L'éventail" de conditions culturelles pouvait néanmoins laisser supposer qu'il serait possible d'accéder, dans certaines des conditions définies, à des croissances microbiennes et donc d'aboutir à des caractérisations phénotypiques. Cependant, un deuxième obstacle (et non le moindre !) a été rencontré : les temps d'incubation nécessaires à la croissance des microorganismes anaérobies *in vitro*. Ainsi, plusieurs semaines à plusieurs mois d'incubation ont été fréquemment nécessaires pour observer une croissance significative en milieu liquide, et l'obtention d'une colonie sur milieu gélosé implique le plus souvent des durées encore plus importantes. Ces durées d'incubation sont ainsi difficilement compatibles avec une finalisation des analyses dans les limites imparties d'une thèse.

I.A.3. Psychrophilie et "Barophilie".

Si la méconnaissance des microorganismes anaérobies de la strate profonde du Lac Pavin ne permettait que de spéculer sur des fonctions putatives, il était néanmoins acquis que ces derniers étaient capables de croître à des températures psychrophiles (4°C, température du monimolimnion) et à des pressions comprises entre 7 et 10 atm¹. Si le respect de ces conditions apparaissait être l'approche la plus pertinente, il est apparu difficile de concilier ces conditions drastiques avec l'acquisition de données. En effet, les temps de croissances des microorganismes *in vitro* à 4°C étaient beaucoup trop importants pour permettre leurs études. Ainsi, les cultures ont elles été incubées à des températures comprises entre 20°C et 25°C. D'autre part, si les pressions subies par les microorganismes dans la strate profonde du Lac Pavin ne sont probablement pas sélective de microorganismes barophiles stricts, il n'en demeure pas moins qu'elles ont potentiellement une influence sur ces derniers. Les contraintes techniques n'ont pas permis, lors

¹ La pression augmentant de 1 atm tous les 10 mètres, les microorganismes présents à 60 m sont donc soumis à des pressions de l'ordre de 7 atm, ceux présents à 90 m subissent une pression de 10 atm.

de la phase de prélèvement ou lors de la période d'incubation, de conserver des conditions de pression identiques à celles observées dans le milieu naturel. Il apparaît néanmoins évident que ce facteur sera à prendre en compte dans les études futures.

Considérant les difficultés évoquées, il est difficile de présenter un travail complètement abouti dans le cadre de cette thèse. Des enrichissements significatifs ont été observés dans des conditions de culture particulièrement intéressantes (conditions hydrogénotrophes, Mn (IV) comme accepteur final d'électrons, conditions ultra-oligotrophes, *etc.*) et actuellement de nombreux microorganismes sont (ou en voie) d'être isolés. Ces isolats microbiens pourront être utilisées ultérieurement pour élaborer une "souchothèque" de bactéries anaérobies du Lac Pavin et permettre potentiellement, à terme, de réaliser *in vitro* des reconstructions de réseaux métaboliques, des études d'interactions et de compétitions permettant de comprendre, dans ces conditions simplifiées, comment interagissent entre elles différentes populations microbiennes. Ces différents isollements ne seront pas présentés dans cette thèse et ce chapitre sera essentiellement focalisé sur le processus de réduction dissimilatrice du Fe (III) que nous avons particulièrement étudié en raison de la position d'oxydant majoritaire de cet élément au sein de la zone anoxique du Lac Pavin. Une section sera également dévolue à l'acétogénèse réductrice. En effet, les résultats des études *in situ* (Article 3) ont révélé que les communautés de méthanogènes étaient dominées par des espèces affiliées au genre *Methanosaeta* (incluant les méthanogènes acétoclastiques). L'acétate peut ainsi constituer un précurseur métabolique primordial de la méthanogénèse dans cette zone anoxique profonde.

I.B. Présentation succincte des études réalisées

I.B.1. Etude du processus de réduction dissimilatrice du Fe(III)

Le premier objectif de l'étude de ce processus était de déterminer les donneurs d'électrons ainsi que les formes ferriques (particulaires ou dissoutes) préférentiellement utilisés par les microorganismes ferro-réducteurs (BFR). Cette première étude avait également pour but d'analyser, en relation avec l'activité de réduction du Fe (III), la sélectivité de différentes conditions de culture sur les communautés microbiennes, et d'accéder à l'identification d'espèces bactériennes et à l'isolement de BFR potentielles. Cette étude sera présentée dans le pré-Article 4. L'étude conduite *in situ* sur la diversité phylogénétique des communautés microbiennes anaérobies de Lac Pavin (Article 3) n'a pas révélé de séquences finement affiliées à des familles de BFR obligatoires. Ces observations suggèrent que la réduction du Fe (III) peut être réalisée par

des microorganismes ferro-réducteurs obligatoires mais non encore identifiés comme tels. Une seconde hypothèse est que ce processus peut également constituer une voie métabolique alternative utilisée par des bactéries non ferro-réductrices obligatoires. Cette dernière hypothèse a été étudiée sur une souche isolée du Lac Pavin. Ce modèle permettant d'émettre des hypothèses sur l'avantage écologique potentiel que peut procurer cette voie alternative à des microorganismes non ferro-réducteurs obligatoires. Un certain nombre d'étapes étant encore nécessaires pour finaliser cette étude, ce travail sera présenté sous la forme d'une "pré-publication" rédigée en français (Pré-Article 5).

I.B.2. Etude d'un biofilm acétogène

Au cours des procédures d'enrichissement et d'isolement, le développement d'un biofilm présentant une structure très particulière a suscité notre attention. Si les conditions initiales de culture n'étaient pas à priori sélectives de bactéries acétogènes, il s'avère néanmoins qu'une ou plusieurs des espèces constituant ce biofilm présentent la capacité de produire de l'acétate *via* H_2/CO_2 . Cette particularité confère à cette étude un double intérêt. D'une part l'acétogénèse reste un processus peu étudié (*cf.* Revue bibliographique) et l'acquisition de nouvelles informations sur ce métabolisme est particulièrement stimulante. D'autre part, l'acétate peut constituer un des principaux précurseurs de la méthanogénèse dans la strate anoxique profonde du Lac Pavin. Ainsi, l'étude et la caractérisation de ce biofilm peut constituer une étape préliminaire dans le développement d'une stratégie d'étude d'interactions *in vitro* (comme évoqué dans le paragraphe précédent) impliquant dans ce cas des bactéries acétogènes et des *Archaea* méthanogènes.

Dans le cadre de perspectives d'écologie générale, si à terme l'isolement de ces espèces en culture pure révèle que chacune d'entre elle est acétogène, cet assemblage microbien peut constituer un bon modèle pour analyser le processus de redondance fonctionnelle dont nous avons préalablement suggérer l'importance dans les écosystèmes naturels (Article 1 et 2). Cette étude est présentée en raison des perspectives intéressantes qu'elles offrent, cependant comme précédemment, ce travail encore non finalisé fera l'objet d'une pré-publication rédigée en français (Pré-Article 6).

II. MATERIEL ET METHODES

Au cours des études conduites sur les communautés microbiennes du monimolimnion du Lac Pavin, les méthodes culturales anaérobies qualifiées de "classiques" (Balch *et al.* 1979, Hungate 1969) ont été utilisées. Les procédures de culture en anaérobiose sont, comme nous l'avons souligné précédemment, d'application récente au Laboratoire de Biologie des Protistes (débutées

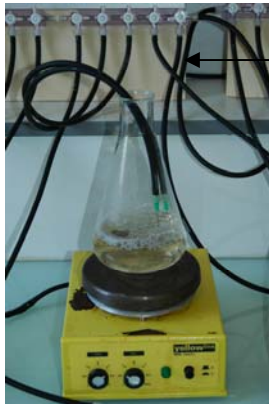


Figure C.15: Après ébullition (10 minutes), les milieux de culture sont refroidis (jusqu'à 60°C) sous atmosphère CO_2 ou N_2 .

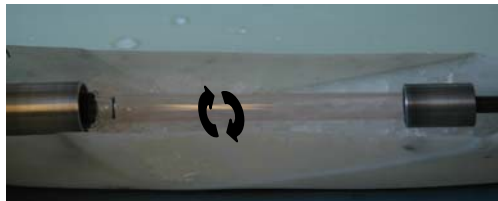


Figure C.16: Après ajouts du réducteur et éventuellement de la solution tampon de bicarbonate de sodium, les milieux de culture sont répartis en tubes de Hungate ou de Balch sous atmosphère CO_2 ou N_2 .

ETAPE 1 : PREPARATION ET REPARTITION DES MILIEUX DE CULTURE

Préchauffage du tube contenant le milieu gélosé à 90°C → Maintien de la gélose en surfusion (65-70°C)

Répartition de la gélose sur les parois du tube par la méthode des "Roll-tubes"

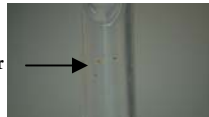


Préparation des gammes de dilution (Milieu de Bryant et Burkey, cf. Annexe 5)

Inoculation des cultures de différentes dilutions dans le tube contenant le milieu gélosé en surfusion

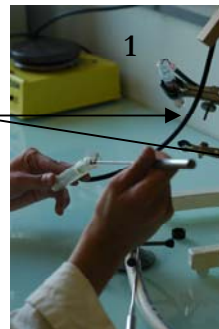
ETAPE 2 : ENSEMENCEMENT SUR MILIEU GELOSE (FIGURE C.17)

Colonies à prélever



Flux CO_2 ou N_2

- 1- Prélèvement de la colonie sur milieu gélosé
- 2- Mise en suspension de la colonie en milieu liquide



ETAPE 3 : ISOLEMENT DE COLONIES (FIGURE C.18)

dans le cadre de cette thèse). Une description succincte des techniques d'enrichissement et d'isolement de microorganismes anaérobies sera ainsi proposée dans cette section.

II.A. Prélèvement des échantillons

Les échantillons destinés à être inoculés dans les milieux de culture doivent être maintenu en anaérobiose constante. Les prélèvements aux profondeurs 60 m, 70 m, et 90 m ont été réalisés par bouteille Van Dorn munie d'un septum central butyle ([Annexe 9](#)). L'eau, prélevée à travers le septum, est transférée dans des tubes de Balch stériles préalablement "flushés" sous CO₂ ou N₂. Les échantillons ont été conservés dans la glace jusqu'à leur inoculation dans les milieux de culture. Le sédiment (strate 0-3 cm) et l'eau sédimentaire superficielle (interface eau/ sédiment) ont été prélevés en utilisant un carottier multiple (Jenkin-Mortimer, [Annexe 9](#)) et les carottes sédimentaires ont été découpées selon le protocole préalablement décrit par **Mallet et Debroas (2000)**.

II.B. Protocole général de préparation et de répartition des milieux de culture en anaérobiose

Les éléments entrant dans la composition basale ([Annexes 2-3, 5](#)) des milieux de culture sont introduits dans un erlen. Le milieu est porté à ébullition (10 min), puis refroidi sous atmosphère CO₂ ou N₂ jusqu'à 60°C ([Figure C.15](#)). La répartition du milieu en tubes (Balch ou Hungate) ou en flacons est réalisée sous la même atmosphère gazeuse ([Figure C.16](#)). Les milieux sont stérilisés par autoclavage (121°C, 20 min). Pour chaque condition de culture les solutions de donneurs et d'accepteurs d'électrons ([Annexe 8](#)) spécifiques, stériles, conservées sous atmosphère anaérobie, sont introduites stérilement à travers le septum. Après ensemencement de l'inoculum, la pressurisation des tubes est réalisée avec un mélange N₂/CO₂ (80 :20) ou H₂/CO₂ (80 :20).

II.C. Protocole général d'ensemencement sur milieu gélosé ([Figure C.17](#)).

Le milieu gélosé présente la même composition minérale et organique que le milieu liquide contenant l'enrichissement d'intérêt, additionné de 15 g.l⁻¹ de Bacto-Agar² (Sigma). Les milieux gélosés sont répartis à raison de 4 ml par tube de Hungate. Les différentes étapes d'ensemencement sur milieu gélosé par la méthode des Rolls-tubes sont schématiquement représentées [Figure C.17](#).

² La concentration en Bacto-Agar peut varier en fonction de la dureté souhaitée de la gélose

II.D. Protocole général d'isolement des colonies (Figure C.18)

A l'issu du temps d'incubation nécessaire à la formation de colonies sur gélose, ces dernières sont prélevées à l'intérieur du tube en conditions stériles sous atmosphère CO_2 ou N_2 avec une anse ou une pipette pasteur et introduite dans un tube contenant du milieu de culture liquide (de même composition).

III. RÉSULTATS

ARTICLE 4

Etude des donneurs d'électrons préférentiellement utilisés par les bactéries anaérobies de la zone anoxique du Lac Pavin pour le processus de réduction dissimilatrice du Fe (III) : une approche culture dépendante.

Lehours A-Catherine, Isabelle Batisson, Gilles Mailhot²,
Annie Guedon and Gérard Fonty

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement-Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6023,

²Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire- Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6505, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

Geomicrobiology Journal

Résumé : Les concentrations élevées en Fe (II) dans la zone anoxique du Lac Pavin suggèrent l'implication de la fraction procaryotique dans le processus de réduction dissimilatrice de cet élément. Afin d'accréditer cette hypothèse, une approche culture dépendante a été développée.

Les principaux objectifs étaient :

- de déterminer les sources de carbone et d'électrons pouvant être potentiellement utilisées pour ce TEAP³
- d'analyser la sélectivité de différentes conditions de culture pouvant refléter la diversité des niches écologiques associées à ce TEAP
- d'identifier des microorganismes potentiellement ferro-réducteurs (FEB).

Deux types de milieux de culture ont été réalisés. Le milieu ME a été formulé afin de simuler au mieux les conditions environnementales naturelles. Le milieu synthétique DF, visant à contrôler la composition minérale et organique des conditions de croissance, constitue le milieu référence.

Le fumarate apparaît être le donneur d'électrons préférentiellement utilisé suggérant que l'utilisation de ce métabolite est énergétiquement plus favorable. Une réduction significative du Fe (III) a également été notée dans les conditions de culture supplémentées en lactate, H₂ et CH₄. Pour la plupart des conditions de culture, la réduction du Fe (III) est accrue sous H₂. Paradoxalement, aucune accumulation de Fe (II) n'a été révélée dans les enrichissements supplémentés en acétate. L'aspect quantitatif de la réduction dépend également de la forme du Fe (III) introduites dans les cultures. Les profils TTGE réalisés pour chaque condition de culture révèlent que la forme ferrique (particulaire ou dissoute), les sources d'électrons et la composition du milieu de culture (ME ou DF) sélectionnent des espèces bactériennes différentes, suggérant que les niches écologiques occupées par les FEB dans la zone anoxique du Lac Pavin sont très diversifiées. L'identification de FEB putatives met en évidence une prépondérance des *Proteobacteria* et des bactéries Gram-positives. Cependant aucune espèce affiliée à des familles de FEB obligatoires n'a été détectée. L'identification de séquences relatives au genre *Desulfovibrio* suggère que certaines BSR pourraient utiliser le Fe (III) dans des processus respiratoires alternatifs. L'affiliation de séquences ARNr16S au sein de groupes de clones issus d'environnements contaminés par des hydrocarbures et des composés chlorés est en accord avec les résultats des études *in situ* (Article 3).

³ TEAP : Terminal Electron Accepting Process

Diversity of culturable bacteria, from the anaerobic zone of the meromictic lake pavin, able to perform dissimilatory-iron reduction in different in vitro conditions

Lehours A-Catherine^{1*}, Isabelle Batisson¹, Gilles Mailhot², Annie Guedon¹
and Gérard Fonty¹.

¹Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement-Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6023, ²Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire- Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6505, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

ABSTRACT

A culture-dependent study was performed with the aim of assessing the carbon, electron and Fe(III) sources used for the dissimilatory Fe(III) reduction pathway and the diversity of culturable Fe(III)-reducers in the anoxic zone of the meromictic Lake Pavin. This metabolic pathway was investigated in enrichment cultures inoculated with water samples collected at 70 m depth in the anoxic zone of Lake Pavin. Combinations of different media, organic acids, and incubation gas phases were performed. The potential for Fe(III) reduction in the different growth conditions was assessed by measuring the accumulation of Fe(II) overtime. Bacterial community structure was determined in each growth conditions by Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis (TTGE) profiles of 16S rDNA genes and bands of interest in positive enrichments were sequenced.

Comparisons of bacterial community structure between growth conditions revealed that the electron donor, the basal media as well as the Fe(III) source yielded to the selection of different bacterial populations, suggesting that Fe(III) reducers occupy different ecological niches in the anoxic zone of Lake Pavin. Facultative Fe(III) reducers, such as fermentative (*e.g. Pseudomonas, Clostridium*) and sulphate-reducing (*e.g. Desulfovibrio sp.*) bacteria, were retrieved in enrichments but well-known obligatory Fe(III) reducers (*e.g. Geobacter*) were not detected. A greater Fe(III) reduction was noted under H₂:CO₂ gas phase, suggesting that H₂ is used as an electron donor for Fe(III) reduction. Acetate was not used as a precursor for this terminal electron-accepting process, and a high Fe(III) reduction was observed with fumarate provided as the electron donor and carbon sources suggesting that this metabolite may be energetically more beneficial for Fe(III)-reducers.

Keywords: lacustrine, monimolimnion, iron cycling, fermentative bacteria, sulfate-reducing bacteria.

* Corresponding author: lehours@sb-roscoff.fr Present address: Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France Phone: (33) 29829379

INTRODUCTION

Dissimilatory Fe(III) reduction is the process in which microorganisms transfer electrons to external ferric iron (Fe(III)), reducing it to ferrous iron (Fe(II)) without assimilating the iron (Lovley 2006). Dissimilatory Fe(III) reducers (FeRB) are phylogenetically and physiologically diverse (Lin et al. 2007). They are found throughout the *Bacteria* and *Archaea* (Lovley et al. 2004, Lin et al. 2007) and can be separated into two major groups: those that support growth by conserving energy from electron transfer to Fe(III) (“Obligate FeRB”) and those that do not (“Facultative FeRB”) (Lovley 2006). The best-characterized of Fe(III)-respirers are strict anaerobes of the family *Geobacteraceae* (Loneragan et al. 1996, Lovley 2006) and versatile facultative anaerobes of the genus *Shewanella* (Lovley et al. 1989). Several sulfate-reducing bacteria have also been shown to be able to enzymatically reduce Fe(III) (Tebo and Obraztsova 1998, Lovley 2006). Numerous papers also report on fermentative microorganisms reducing Fe(III) in anaerobic cultures with the cation being postulated to act as an electron sink (*e.g.* Lovley 1987, 1991; Ehrlich 1996).

FeRB may metabolized a wide variety of compounds with concomitant reduction of Fe(III), including fermentable substrates (such as carbohydrates), fermentation products (formate, acetate, propionate, lactate, *etc.*), and H₂ (Lovley 2006). Theoretical thermodynamic considerations indicate that oxidation of organic compounds with Fe(III) as the terminal electron acceptor should yield more energy than oxidation of compounds using either SO₄²⁻ or CO₂ as terminal electron acceptor (Cummings et al. 2000). Consequently, FeRB have been observed to outcompete both sulfate-reducing bacteria and *Archaea* methanogens for electron donors when available Fe(III) is provided (Lovley and Phillips 1987, Cummings et al. 2000).

Over the last decades, it has become established that dissimilatory Fe(III) reduction is one of the most geochemically significant event that takes place in freshwater (Lovley and Phillips 1986, Venkateswaran et al. 1998) and marine sediments (Lowe et al. 2000, Koretsky et al. 2003). However, the phylogenetic and physiological diversity of FeRB has received only minor attention

in pelagic freshwater systems, probably because few freshwater columns exhibit the environmental conditions that favor the activity of FeRB. The permanent anoxic water column (called the monimolimnion) of Lake Pavin, a unique meromictic lake in France, provides such an environment (Viollier et al. 1995, Lehours et al. 2005). Studies on the geochemistry of Lake Pavin monimolimnion revealed that Fe(III) is the main anaerobic oxidant available for microbial processes (e.g. Viollier et al. 1995, 1997). The high concentrations of dissolved Fe(II) ($>1000\mu\text{M}$, Viollier et al. 1995, Michard et al. 1994) as well as the isotopic measurements of iron ($^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, Busigny et al. 2008) suggest that dissimilatory Fe(III) reduction is an important biogeochemical process in this anoxic layer. However, previous studies on microbial community of this monimolimnion gave conclusions that did not appear consistent with the postulate of a significant role of dissimilatory Fe(III) reduction in iron cycle (Lehours et al. 2005, 2007). A phylogenetic analysis of bacterial community in this anoxic layer did not detect sequences in clone libraries affiliated to known obligate Fe(III) reducers (e. g. *Geobacteraceae*) (Lehours et al. 2007). Moreover, while FeRB can theoretically outcompete methanogens for acetate and H_2 (Roden and Wetzel 2003), methanogenic *Archaea* (particularly acetoclastic methanogens) dominate the microbial community in this monimolimnion (Lehours et al. 2005).

In this study, a culture-dependent approach was performed to investigate the diversity of culturable iron-reducers and the preferential compounds that are used for the dissimilatory Fe(III) reduction process in different growth conditions. To this end, a range of different growth conditions was designed with various electron donors, iron phases, and composition of the media. In each growth condition, Fe(II) accumulation was measured in the course of incubation time and diversity of bacterial communities was assessed by Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis (TTGE). In order to identify putative FeRB, bands of interest were extracted from TTGE gels and sequenced.

MATERIAL AND METHODS

Site characteristics: Lake Pavin is a small (0.44 km²), deep (92 m), and nearly circular lake located at an altitude of 1197 m. A feature peculiar to Lake Pavin is the presence of a stagnant deep-water layer (60 m to 92 m), called the monimolimnion. The monimolimnion is not affected by seasonal mixing and is permanently anoxic. It is separated from the overlying mixolimnion, the seasonal mixed layer, by a chemocline between 60 m and 70 m (Aeschbag-Hertig et al. 1999). Depth profiles of nutrients, oxygen, methane, carbon dioxide, trace elements, Fe(III), Fe(II), and bacterial counts have already been published (Viollier et al. 1995, 1997; Aeschbag-Hertig et al. 1999; Lehours et al. 2005). The structure and the phylogenetic diversity of *Bacteria* and *Archaea* in this anoxic zone were also previously described (Lehours et al. 2005, 2007).

Sampling and Enrichments: In April 2004, water from 70 m was sampled under sterile and anoxic conditions and used as an inoculum in the different growth conditions. While Michard et al. (1994) observed that maximum Fe(II) concentrations was deeper than 70 m, they noted that samples from deeper than 70 m degased at atmospheric pressures making it difficult to replicate the environmental settings in the laboratory experiments. Moreover, this depth was chosen because a maximum in the Fe(II) concentration profile was previously observed in Lake Pavin at 70 m (Lehours et al. 2005) and isotopic measurements of iron suggested that dissimilatory Fe(III) reduction may be high at this depth (Busigny et al. 2008).

Strictly anaerobic techniques were used throughout this study (Hungate 1969, Balch and Wolfe 1976, Bryant 1972). Two media (named DF and ME) were used. For each, pH was adjusted to 7.0. The synthetic DF media (adapted from the “freshwater medium” for FeRB, Lovley 2006) contained (per liter): 1.0 g NaCl, 0.4 g MgCl₂·6H₂O, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, 0.25 g NH₄Cl, 0.2 g KH₂PO₄, 0.5 g KCl, vitamins and trace minerals (Balch et al. 1979), 1 ml selenite-tungstate solution (10 mM NaOH, 0.02 mM Na₂SeO₃·5H₂O, 0.02 mM Na₂WO₄·2H₂O), 1 ml resazurine 0.1%, 5 g NaHCO₃, 1 mM Na₂S. The ME media which was designed "to simulate natural growth

conditions” contained: vitamins and trace minerals (Balch et al. 1979), 1 ml resazurine 0.1%, 5 g NaHCO_3 , and 10 ml sodium thioglycollate solution (10 ml distilled water, 0.1 g sodium thioglycollate, 0.1 g ascorbic acid) added to one liter of 70 m depth sterilized water from Lake Pavin. Both media were boiled, cooled under flowing CO_2 and dispensed into 100-ml serum bottles under the same gas phase. The flasks were capped with butyl rubber stoppers, sealed with aluminium crimps, and sterilized by autoclaving (121°C , 20 min).

After autoclaving and cooling, different combinations of electron acceptors and donors were added to the basal media. Stock solutions of poorly crystalline Fe(III) oxide (HFO), Fe(III)-Nitrilotriacetic acid (FeNTA) (Lovley 2006), and of carbon and electron donors (acetate, lactate, formate and fumarate) were prepared under anaerobic conditions and were added to individual flask of media to provide a final concentration of 20 mM for carbon source and 8 mM for Fe(III) as an electron acceptor. Five milliliters of anoxic water sample from 70 m were inoculated in each flask for a final volume of 50 ml. Duplicates and controls for each of the 36 different growth conditions were performed. Controls were realized by adding 5 ml of a sterilized inoculum of 70 m water sample into the corresponding media (DF or ME) containing the same carbon source and Fe(III) form as for the corresponding duplicates. For each carbon source, incubations of duplicates and controls were performed under N_2/CO_2 (80:20) or under H_2/CO_2 (80:20) gas phases. A specific growth condition included H_2/CO_2 (80:20) as sole carbon source and electron donor. All incubations were carried out at 20°C in the dark during 5 months.

Fe(II) measurements: One milliliter sub-sample was collected with a syringe and a needle just after inoculation of the media (T0) and after 3 weeks (T1), 2 months (T2), 3 months (T3), and 5 months (T4) of incubation. Dissolved Fe(II) concentrations were analyzed photometrically as complexes with 1,10-orthophenantroline by a spectrophotometer at 510 nm (Kalver and Pitts 1966, Nierop et al. 2002). Graphics were displayed by calculating the mean Fe(II) concentration value in duplicates for each growth conditions. Fe(II) concentration in control was used as the set reference at each sampling time ($\text{Fe(II)} = (([\text{Fe(II)}]_{1x} + [\text{Fe(II)}]_{2x}) / 2) - [\text{Fe(II)}]_{c_{12x}}$), where $[\text{Fe(II)}]_{1x}$

and $[\text{Fe(II)}_{2x}]$ were respectively the Fe (II) concentrations in the duplicates 1 and 2 at the sampling date x and $[\text{Fe (II)}_{c_{12x}}]$ is the Fe (II) concentration in the corresponding control at the same sampling date.

TTGE profiling and analysis: For each growth condition, DNA was extracted from a 10 ml sub-sample at T3 as previously described (Jardillier et al. 2004). To selectively amplify the bacterial 16S rDNA genes, the combination of the primers 27f modified with a GC-rich sequence at the 5' end (GC-27f, 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GCG GCG GGG GCA CGG GGG GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3', Weisburg et al. 1991) and 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', Muyzer et al. 1993) was used. Reaction mixture contained 5 μl 10X buffer, 2 mM MgCl_2 , 200 μM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP; Eurobio, France), 1.25 U of Hot Star Taq DNA polymerase (Qiagen, France), 10 pmoles of each oligonucleotide primer, 50-100 ng of template DNA to a final volume of 50 μl . DNA amplification was performed with a model PTC-200 cycler (MJ research Inc., Waltham, Massachusetts, USA) by using the following program: a 15 min hot start at 95 °C, followed by 30 cycles consisting of denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 55°C), and extension (30 s at 72 °C) and a final extension at 72°C for 7 min. Amplified DNA was checked by electrophoresis in 1% agarose in 1X TBE and quantified with the DNA Quantitation Kit Fluorescence Assay (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. TTGE was performed with the BioRad DCode system (BioRad, France). One hundred nanogrammes of PCR product were loaded onto 8% (wt/vol) polyacrylamide gel (7 M urea, 1.25X TAE, 0.06% Temed and 0.06% ammonium persulfate). Gels were electrophoresed in 1.25X TAE buffer at 68V for 17 h with a temperature range from 66°C to 69.6°C and a ramp rate of 0.2°C per hour. The reference patterns consisted of a mixture of V1 to V3 amplified 16S rDNA fragments of three bacterial strains (*Aeromonas caviae*, *Kurthia zopfii*, *Escherichia coli*). Following electrophoresis, gels were stained in GelStar® Nucleic Acid stain bath (BMA Bio Whittaker Molecular Application, Rockland, USA) and the banding patterns were examined under ultraviolet light. Gels were digitally photographed

(Versa Doc™ Imaging System (BioRad, France)) and stored as TIFF files. Gel images were converted, normalized and analyzed with the GelCompare 4.6 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Sample comparison was conducted using numerical analyses of TTGE profiles. The Pearson correlation coefficient, a robust and objective coefficient (van Verseveld and Röling 2004) and the unweighted pair group clustering method with arithmetic averages (UPGMA) were applied as previously described (Röling et al. 2001). In band assignment, a 1% band position tolerance (relative to total length of the gel) was applied, which indicates the maximal shift allowed for two bands in different TTGE tracks to be considered as identical. The consistence of a cluster is expressed by the cophenetic correlation which calculates the correlation between the dendrogram-derived similarities and the matrix similarities. The number of bands in a profile was expressed as the phylotype richness and the Shannon-Weiner index (H') was calculated as previously described (Hill et al. 2003).

Sequencing and phylogenetic analyses: Bands of interest were cut out from the TTGE gels. After incubation for 18 h at 37°C in 200 µl of elution buffer (1 mM EDTA (pH 8), 0.5 M ammonium acetate), the DNA contained in supernatant was precipitated with 2 volumes of chilled absolute ethanol and incubated at -20°C for 1 hour. After centrifugation (12000 × g , 4°C, 10 min), the DNA pellets were resuspended in 200 µl TE buffer and precipitated with 25 µl of ammonium acetate (3 M, pH 5.2) and 0.7 volume of isopropanol, washed with 70% ethanol, dried in a desiccator for 10 to 15 min, and carefully resuspended in 25 µl of TE buffer (pH 8). Five microliters of DNA extracted from TTGE band were reamplified using the previously described reaction mixture and PCR program. Amplified products were visualized after gel electrophoresis (1% agarose in 1X TBE buffer). To ensure purity of the band, PCR products from DNA extract were electrophoresed on a TTGE gel and extracted again. This procedure was realized twice for each band extracted. Purified DNA bands were then amplified using the bacterial specific primer 27f and the universal primer 518r as previously described.

Fresh amplicons were ligated using pGEM-T-Easy cloning kit (Promega, Madison, Wis.) and transformed into XL1 blue *Escherichia coli* competent cells. Recombinant clones were detected by blue-white colony selection on Luria-Bertani (LB) plates containing 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of ampicillin, 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), and 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Clone libraries were constructed from randomly-picked white colonies. In each case, 10 colonies were selected. Plasmid DNA was extracted and amplified with GC-27f /518r primers using the previously described PCR program. Amplicons were electrophoresed on TGE gels with the original band to ensure that their distance of migration was similar. Clones were sequenced by MWG Biotech Company (Roissy CDG, France). Sequences were compared to available databases by use of the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) network service (Altschul et al. 1990) to determine approximate phylogenetic affiliations. Phylogenetic analyses of cloned 16S rDNA sequences were carried out using ARB software and its associated database (Ludwig et al. 2004) after alignment and manual adjustment following consideration of secondary structures. Neighbour-joining trees were constructed and partial sequences from clone libraries were inserted using ARB while retaining overall tree topology. The robustness of inferred topologies was tested by bootstrap analysis using PHYLIP (Felsenstein 1993).

Nucleotide sequence accession numbers: Nucleotide sequences were deposited in the Genbank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) under Accession No. EU082036 to EU082064.

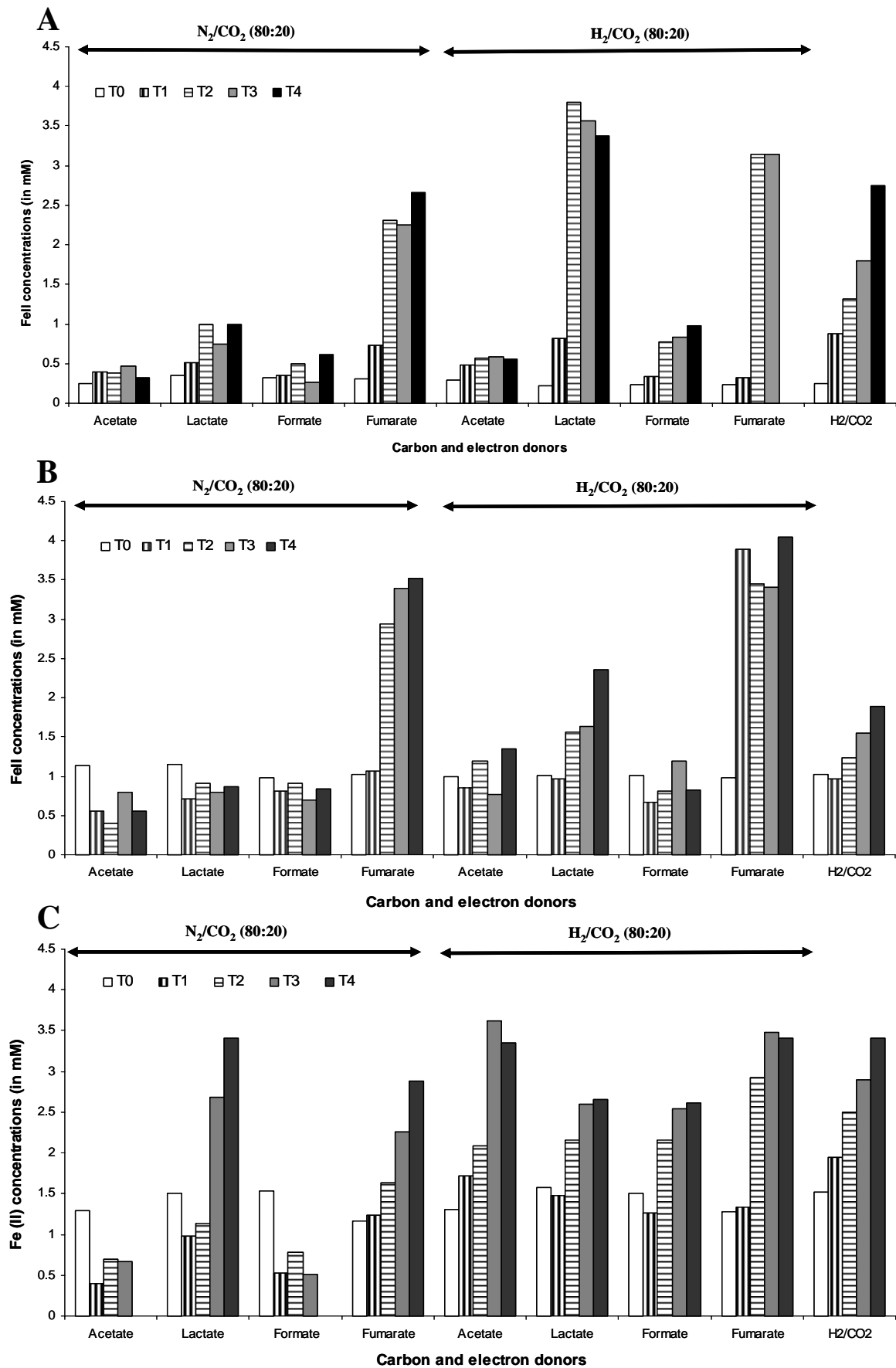


Figure 1: Temporal evolution of aqueous Fe(II) concentrations in (A) DF media with HFO (T4 sample for fumarate under H_2/CO_2 is missing); (B) DF media with FeNTA; (C) ME media with HFO.

RESULTS

Fe(II) concentrations according to growth conditions (Fig.1): Fe(III)-reduction was determined in enrichments by measuring the production of Fe(II) for aqueous iron. An underestimation of the total Fe(II) produced was assumed because Fe(II) might be bound to HFO or in the solid phase. This might account for the apparent decrease in Fe(II) concentration in some of the treatments over time (e.g. lactate under H₂/CO₂ treatment, Fig.1A).

In DF media with HFO, an increase in aqueous Fe(II) concentration was observed over the course of the experiment in samples containing lactate and fumarate under both N₂/CO₂ and H₂/CO₂ gas phases and in samples with only H₂ as an electron donor, and also in samples containing formate under H₂/CO₂ (Fig. 1A). In the DF-FeNTA media, an increase in Fe(II) concentration in fumarate samples was noted under both gas phases, and also an increase in Fe(II) concentration with the presence of H₂/CO₂ (e. g. lactate conditions, Fig. 1B). For both DF media, greater Fe(II) accumulations were observed in enrichments performed under H₂/CO₂ gas phase (e.g. in DF-FeNTA media at T4, Fe(II) concentrations were 64% (lactate) and 13% (fumarate) higher under H₂/CO₂ than under N₂/CO₂ (Fig. 1B) - in DF-HFO media, Fe(II) concentrations at T4 were 70% (lactate) and 37% (formate) higher under H₂/CO₂ than under N₂/CO₂ gas phases (Fig. 1A)).

In ME-HFO medium, Fe(II) accumulation was observed in all incubations under H₂/CO₂ but no increase in Fe(II) concentrations was noted with acetate and formate under N₂/CO₂ (Fig.1C). In both DF and ME media incubated under N₂/CO₂, an accumulation of Fe(II) over the course of the incubation indicated that lactate and fumarate effectively stimulated Fe(III) reduction in samples (Fig. 1). Conversely, a lack of Fe(II) accumulation in samples containing acetate and formate indicated that these electron donors were not effective at stimulating Fe(III) reduction (Fig. 1).

With the exception of fumarate growth conditions (Fig. 1B), a greater Fe(III) reduction was noted in enrichments performed with HFO (Fig. 1A and 1C) than in enrichments with FeNTA

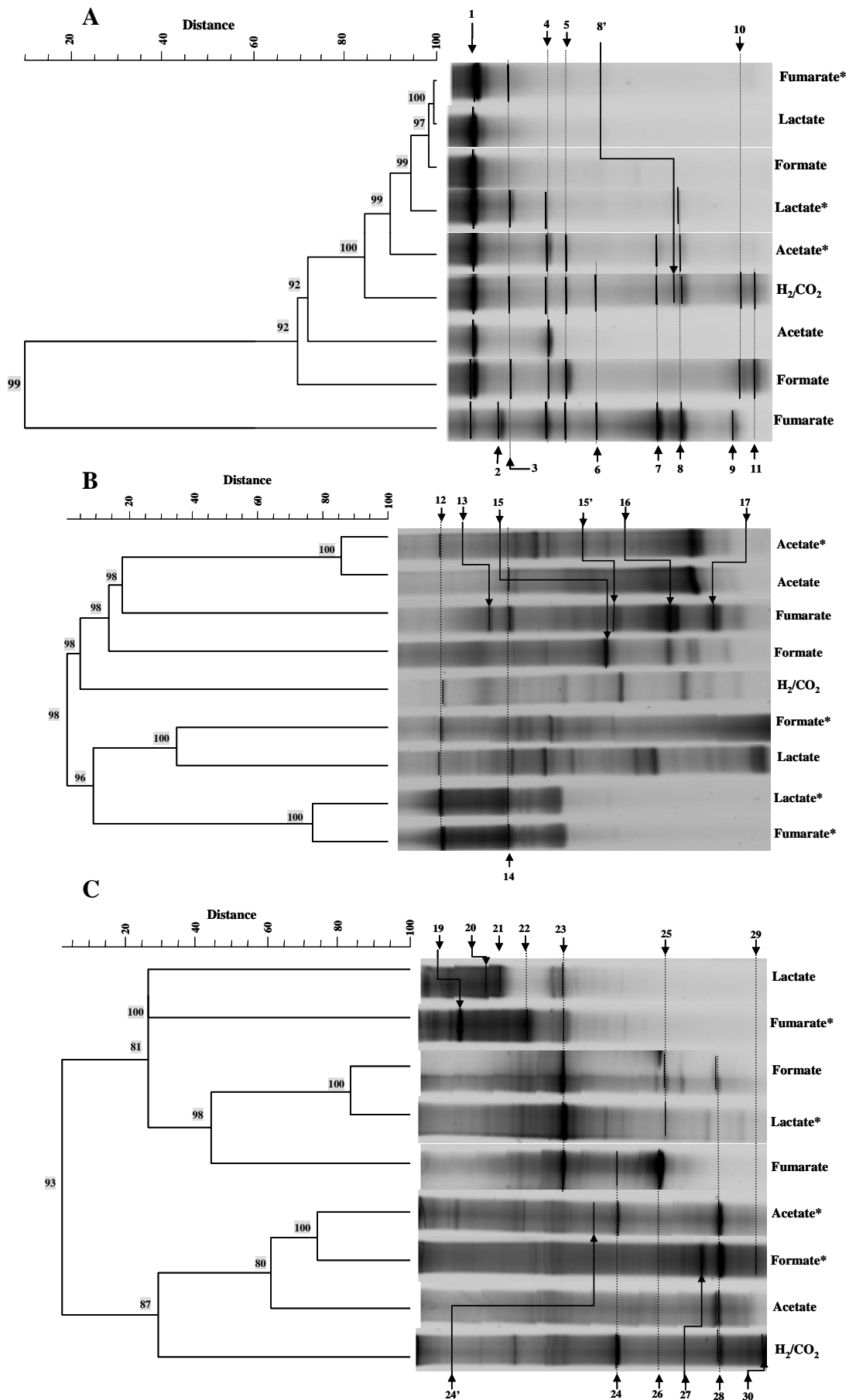


Figure 2: UPGMA cluster analyses of 16S rDNA gene-based TTGE profiles of bacterial communities in Fe (III)-reducing enrichments containing different Fe(III), carbon and electron sources and inoculated with water samples from Lake Pavin: (A) DF media with HFO; (B) DF media with FeNTA; (C) ME media with HFO. Growth conditions performed under H₂/CO₂ gas phase are indicated by *.

Consistence of the clusters is expressed by cophenetic correlation; the values are shown at each branch. Bands extracted from TTGE gels are marked (—), numbered and their identities are given in Figures 3 and 4.

(Fig. 1B). In ME-FeNTA media, no increase in dissolved Fe(II) concentrations was observed (data not shown).

Community structure in Fe(III) enrichments: In order to compare *in situ* communities with communities in the enrichments, a TTGE profile was also performed from a 70 m depth DNA sample. Only numerous faint bands were observed (data not shown) highlighting the high diversity of natural communities as previously noted (Lehours et al. 2005).

Considering that Fe(III)-reduction was not observed in ME media with FeNTA, the community fingerprint was not performed in these incubations. Compared to *in situ* sample, Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE) profiles of amplified 16S rDNA genes from enrichments revealed a more simple bacterial community pattern due to adaptation of communities to new environmental conditions (culture medium and bottle effect, Massana et al. 2001). In DF-HFO enrichments, the bacterial diversity was low ($H' = 0.9 \pm 0.8$). A more complex bacterial community structure was noted in DF-FeNTA ($H' = 2 \pm 0.4$) and ME-HFO ($H' = 2 \pm 0.3$) media. UPGMA cluster analyses of TTGE profiles revealed more similarities between the bacterial communities in DF-HFO growth conditions ($> 60\%$, excepted for fumarate enrichment, Fig. 2A) than for those in DF-FeNTA and ME-HFO media ($< 40\%$, Fig. 2B and 2C). Cluster analysis of TTGE profiles of all enrichments suggested that variations in community structure were observed according to the media and no cluster was observed according to carbon and electron sources (see Fig.S.1 of the supplemental material).

Phylogenetic analysis of Fe(III)-reducing enrichments: Thirty two bands were excised from enrichments where Fe(II) accumulation was noted (Fig. 2). For 6 bands, we were not able to reamplify the corresponding 16S rDNA genes. The resulting 26 bands were sequenced to assess the identity of the corresponding organism (Fig. 2). Sequence analyses of the 26 bands indicated that the corresponding strains belonged to the phylum *Proteobacteria* (including α -, β -, δ -, γ - and ϵ -sub-classes), the two phyla of Gram-positive *Bacteria* (*Firmicutes* and *Actinobacteria*), and to a lesser extent to the *Planctomycetes* and *Spirochaetes* (Fig. 3 and 4). Bands encountered in different growth

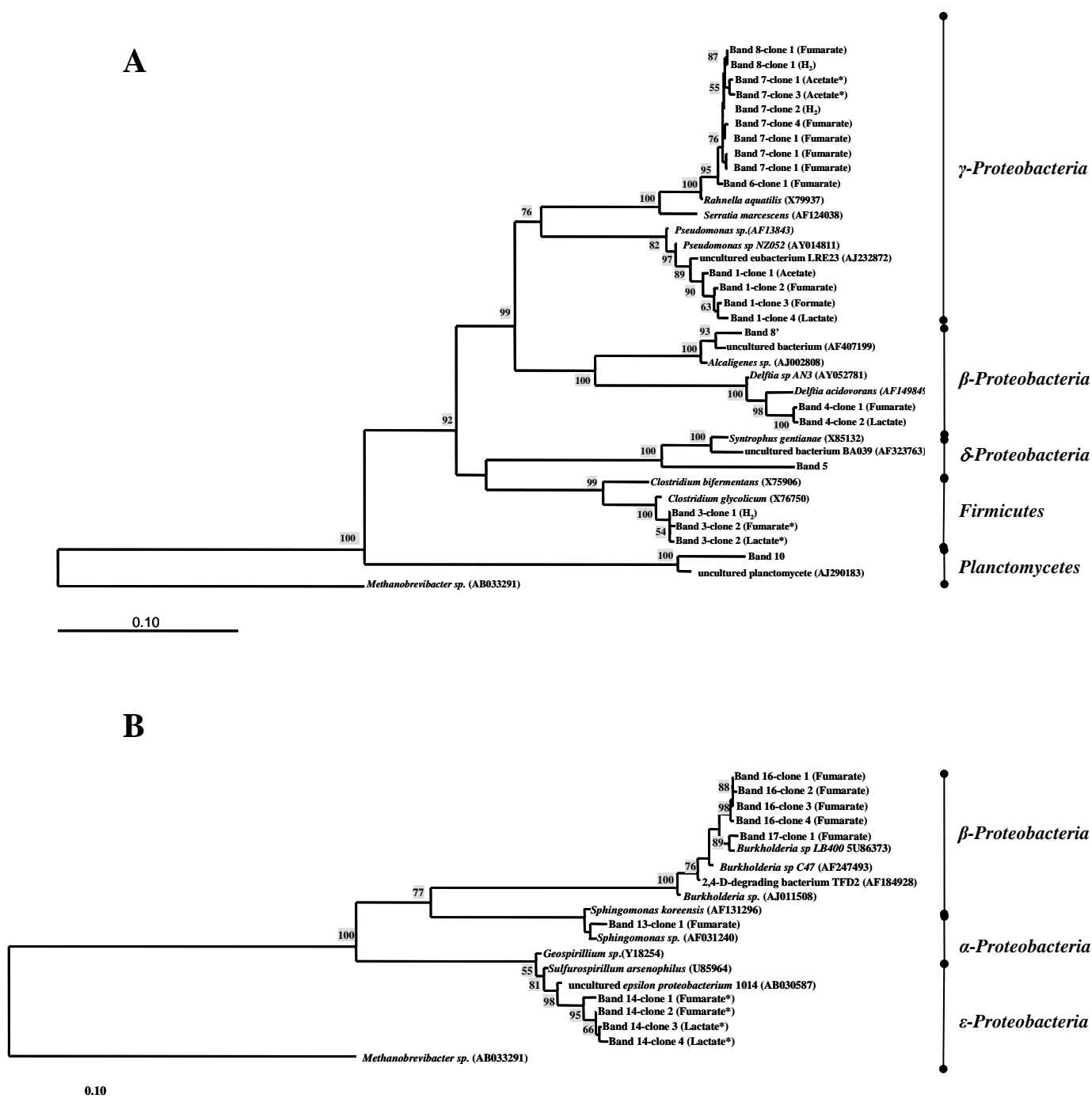


Figure 3: Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences for clones obtained from TTGE bands (for No. see Fig. 2A and 2B) in (A) DF-HFO media and (B) in DF-FeNTA. Neighbor-joining analysis was performed on 500 base positions. Only bootstrap values above 50 % are shown (for 1000 re-sampling). If a band was observed, from different growth conditions, at the same position in the TTGE gel (e.g. bands 7, 8, 1), sequencing was performed from at least two samples.

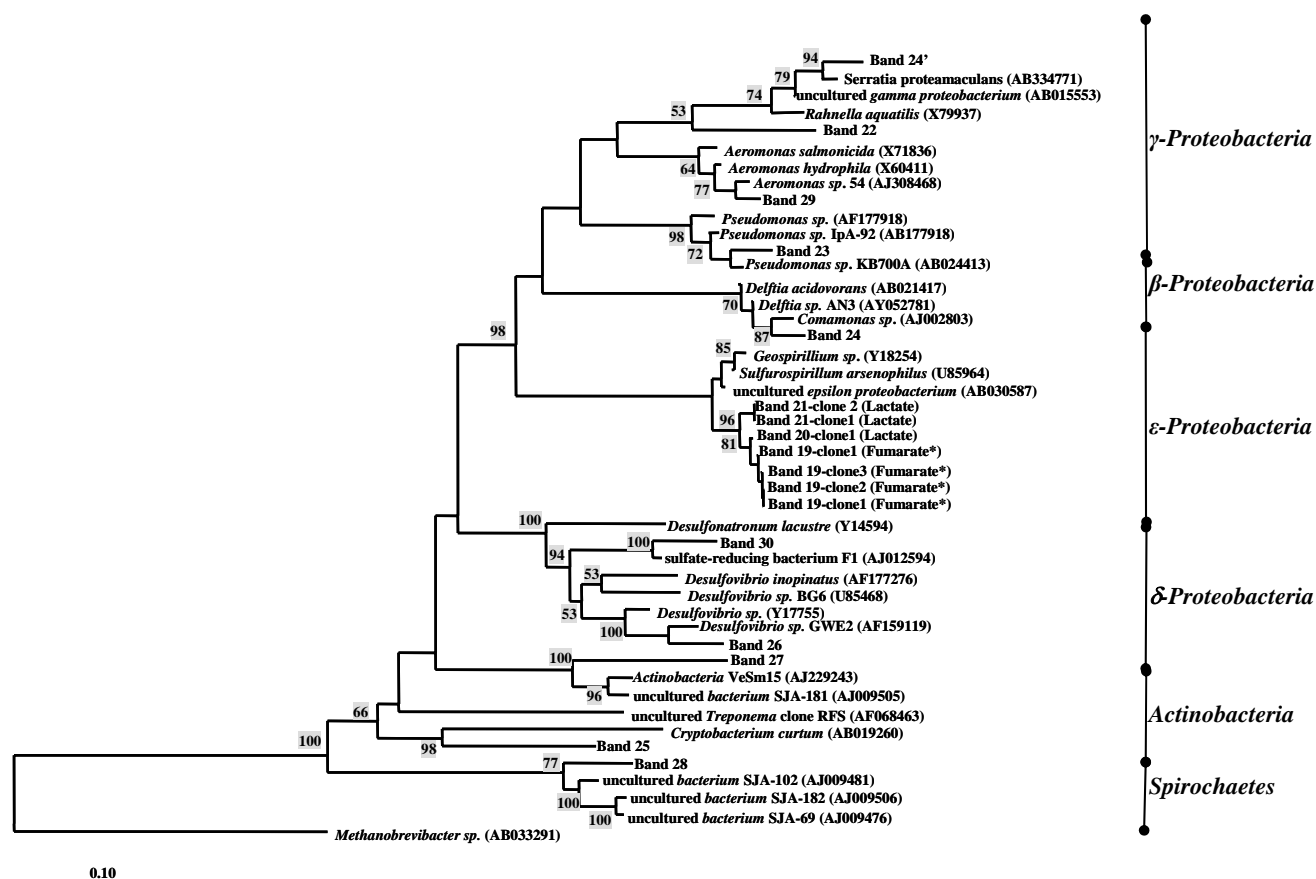


Figure 4: Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences for clones obtained from TTGE bands (for No. See Fig. 2C) in ME-HFO media. Neighbor-joining analysis was performed as for Fig. 3.

conditions but running at the same position in TTGE gels were clustered together (Fig. 3 and 4) and exhibit more than 98% similarity (data not shown). Among the *Proteobacteria*, 5 bands retrieved in DF-FeNTA and ME-HFO enrichments were affiliated to *Sulfurospirillum multivorans* (related to *Geospirillum sp.*, Fig. 3B and 4), a dehalorespirer microorganism (McBeth et al. 2004; Luijten et al. 2003). Clones representatives of bands 1 and 23 were affiliated to *Pseudomonas sp.* (Fig. 3A and 4). Other facultative anaerobes, within the γ -*Proteobacteria* have been identified (e.g. band 29 was affiliated to *Aeromonas sp.*, Fig. 4). A number of bands were affiliated to fermentative microorganisms (e.g. bands 6, 7, 8, 22, 24' were affiliated to *Rahnella aquatilis* within the *Serratia* genus; band 3 was affiliated to *Clostridium glycolicum*, Fig. 3A and 4). Bands 26 and 30 retrieved in ME enrichments with fumarate and H_2/CO_2 presented the highest intensities in TTGE profiles (Fig. 2C) and were affiliated to the genera *Desulfovibrio* (Fig. 4).

DISCUSSION

The high and constant availability of Fe(III) (Viollier et al. 1995, 1997), the high concentrations of Fe(II) (Lehours et al. 2005) as well as the isotopic iron ratio ($^{56}Fe/^{54}Fe$, Busigny et al. 2008) indicate potential for dissimilatory Fe(III) reduction in Lake Pavin anoxic zone, especially at 70 m depth. In this study a culture-dependent strategy was performed to determine carbon, electron and Fe(III) forms that may be used for the dissimilatory Fe(III) reduction pathway and to assess the diversity of culturable iron-reducers in the anoxic zone of Lake Pavin. Despite pitfalls of molecular methods (DNA extraction, PCR, and profiling; von Wintzingerode et al. 1997), TTGE was used to determine bacterial community structure in each growth condition as it was previously shown to be a useful technique for these analyses (Lin et al. 2007).

Putative FeRB in enrichments

From TTGE profiles, an effect of each parameters (media, carbon and electron sources, Fe(III) forms) on the structure of bacterial community in enrichments was noted suggesting that Fe(III)-reducers may occupy different ecological niches in the anoxic zone of Lake Pavin.

However, no known obligatory Fe(III)-reducing bacteria (such as members of the genus *Geobacter*) were retrieved in Fe(III)-reducing enrichments. Our results revealed that most of the bacteria detected in enrichments were facultative Fe(III)-reducers and agreed with previous culture-independent studies of anaerobic communities in the water column of Lake Pavin (Lehours et al. 2007). Similar observations were made by Lin et al. (2007) in sediments of the Scheldt estuary (Northwest Europe). We nevertheless assume that this experiment was performed from one sampling date and despite the fact that Lake Pavin anoxic layer is in a steady state (Aeschbag-Hertig et al. 1999), we can not completely exclude that temporal (*e.g.* seasonal) fluctuations in FeRB populations occur and that we missed some FeRB organisms.

Most of the 16S rDNA sequences retrieved were affiliated to *Proteobacteria* and Gram-positive *Bacteria* (Fig. 3 and 4). Some sequences belong to *Serratia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, and *Clostridium*, all known to be able to reduce Fe (III). The occurrence of these species in our growth conditions show that the culture-dependent strategy performed in this study allowed the selection of effective Fe(III)-reducers. Previously, it was found that *Serratia marcescens* strain was able to reduce hematite with glucose-asparagine as electron donor (Ottow 1970, Lovley 2006). Numbers of *Pseudomonas* species have been shown to reduce Fe(III) under anaerobic conditions (Lonergan et al. 1996, Lovley 2006) and their wide occurrence in all DF-HFO enrichments suggest that they were significantly involved in Fe(III)-reduction. Several Fe(III)-reducing *Clostridium* species have been described (Hammann and Ottow 1974, Dobbin et al. 1999, Park et al. 2001), all using Fe(III) as an electron sink as reported for *C. beijerinckii* and *C. butyricum* (Dobbin et al. 1999, Park et al. 2001) in order to harvest more free energy per unit carbon dissimilated (Lin et al. 2007). Members of the genera *Aeromonas* have also been shown to use small organic acids and hydrogen as electron donors for Fe(III) reduction and to conserve energy to support growth from this metabolic pathway (Knight and Blakemore 1998, Lovley 2006). Some sequences were retrieved in both “active” and “inactive” metal-reducing conditions (*e.g.* bands 1, 4, 8, Fig. 2) suggesting that Fe(III) reduction process might be dependent of the carbon and electron sources and/or of the

bacterial community composition in the enrichment for some of these putative FeRB (*e.g.* *Pseudomonas*).

16S rDNA sequences from clones derived from bands 14, 19, 20, 21 (Fig. 2B and 2C) were affiliated to *Sulfurospirillum multivorans* (Fig. 3B and 4), a dehalorespirer microorganism (McBeth et al. 2004; Luijten et al. 2003) and sequence of band 28 (Fig. 2C) was related to a cluster (SJA, Fig. 4) retrieved from a trichlorobenzene contaminated system (von Wintzingerode et al. 1999). These observations are in agreement with results of Lehours et al. (2007) who detected numbers of sequences in the clone libraries from Lake Pavin anoxic zone related to clones retrieved in contaminated sediments. The ferric iron reduction, often involved in detoxification processes (Lovley 2006), was suggested to be the link to explain this unexpected relationship. In ME-HFO media, two sequences (corresponding to bands 26 and 30, Fig. 2C) were affiliated to the genus *Desulfovibrio* (Fig. 4). Many respiratory microorganisms that grow anaerobically with sulfate serving as the electron acceptor also have the ability to enzymatically reduce iron (Lovley 2006). Our observation also agrees with a previous hypothesis which suggested that members of the *Desulfovibrio* genus detected in the chemocline of Lake Pavin were involved in Fe(III)-reduction (Lehours et al. 2005).

Nevertheless we assume that microorganisms generally grow with doubling times ranging from days to months under limiting substrate concentrations (Whitman et al. 1998; Lin et al. 2007). Batch enrichments tend to select for the fastest growing microorganisms and may select relatively rare but opportunistic and fast-growing species (Button et al. 1993; Lin et al. 2007). This pitfall might also be increased by the concentration of organic carbon used in this experiment which is higher than that seen in the natural setting (Lehours et al. 2005).

Considering the conditions that prevail in the monimolimnion of Lake Pavin (Viollier et al. 1995, 1997; Lehours et al. 2005) it may be possible that these conditions favor the survival of physiological versatile microorganisms. All the sequences retrieved were affiliated to quite versatile strains in regard to their ability for anaerobic growth with a range of electron acceptor

(e.g. *Clostridium*, *Desulfovibrio*), their ability for aerobic growth (e.g. *Pseudomonas*, *Aeromonas*) or their ability to survive as spores (e.g. *Clostridium*).

Iron phases and carbon/electron sources

Our results are consistent with previous studies which revealed that HFO is used preferentially over FeNTA by microorganisms for Fe(III) reduction (Phillips et al. 1993; Lovley 2006). The slow and low reduction of FeNTA in DF-FeNTA conditions (Fig. 1) as well as the lack of Fe(III) reduction in ME-FeNTA media (data not shown) may be the result of the frequent toxicity of this chelated Fe(III) (Lovley 2006).

The greatest Fe(III) reduction observed in enrichments performed under H₂/CO₂ gas phase is in agreement with previous studies which revealed that numerous FeRB are able to grow with H₂ as electron donor (Lovley 2006) and that addition of hydrogen stimulated Fe(III) reduction in submerged paddy soils (Saito and Watanabe 1978) and aquatic sediments (Lovley and Phillips 1986). A surprising and unexpected result is that acetate was not used for Fe(III) reduction in the enrichments (Fig. 1) because this organic acid is usually a precursor of this terminal electron-accepting process (Lovley 2006). In most freshwater environments, Fe(III) reduction and methanogenesis are the dominant processes (Roden and Wetzel 1996, van Bodegom and Stams 1999) but the higher affinity for acetate gives to Fe(III) reducers some competitive advantages over methanogens (van Bodegom and Stams 1999). However, in the steady state environment of Lake Pavin anoxic zone (Aeschbag-Hertig et al. 1999), acetate may be preferentially used for methanogenesis. This hypothesis is consistent with the dominance of the methanogenic communities by *Methanosaeta concilii*, an acetoclastic methanogenic species (Lehours et al. 2005, 2007). This hypothesis also agrees with the result of van Bodegom et al. (2004) who demonstrated that hydrogenotrophic methanogens are more directly inhibited by Fe(III) than *Methanosaeta concilii*.

In this study, fumarate was one of the carbon sources preferentially used for Fe(III) reduction in our growth conditions (Fig. 1). The ability to gain energy from anaerobic respiration with

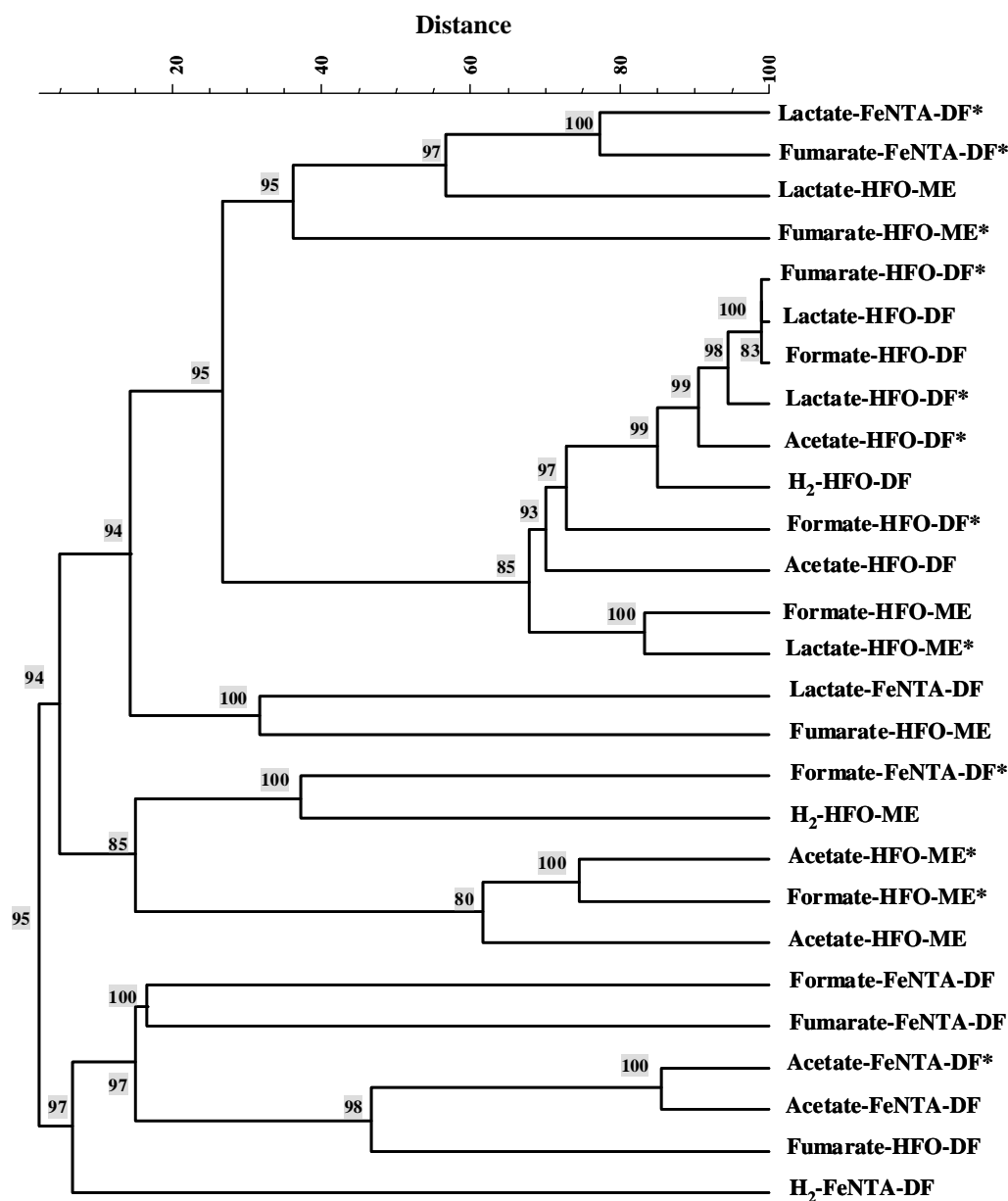


Figure S.1: UPGMA cluster analyses of 16S rDNA gene-based TTGE profiles of bacterial communities in all Fe (III)-reducing enrichments containing different Fe(III), carbon and electron sources and inoculated with water samples from Lake Pavin. The growth condition is indicated as follows: carbon source-Fe(III) form-basal media. Growth conditions performed under H₂/CO₂ gas phase are indicated by *. Consistence of the clusters is expressed by cophenetic correlation; the values are shown at each branch.

fumarate as the electron acceptor is a common property among facultative and strictly anaerobic bacteria (Van Kuijk et al. 1998), but few reports exist on the role of fumarate as an electron donor. It is possible that microbial metabolism of fermentable substrates added could have yielded the actual electron donors (*e.g.* fumarate would lead to the production of acetate and succinate). However, the repeated observations of highest Fe(III) reduction in fumarate enrichments in this study and in current analyses of FeRB communities in Lake Pavin (unpublished data) suggest that our observations are not mainly the result of cross-feeding interactions. It has already been shown that some sulphate-reducing bacteria (such as *Desulfovibrio desulfuricans*) are able to grow by fumarate disproportionation (Zaunmüller et al. 2006, Postgate 1984). Fumarate disproportionation by the bacteria yields to the oxidation of fumarate to acetate and to the reduction of fumarate to succinate (Zaunmüller et al. 2006). The use of this metabolite in catabolic processes may probably represent an effective adaptation to conditions found in most subsurface environments. The scarcity of readily metabolizable organic matter greatly limits microbial growth in the subsurface, in contrast, Fe(III) is often the most abundant electron acceptor available for microbial respiration (Esteve-Nunez et al. 2004). In Lake Pavin anoxic layer, if any fumarate becomes available, it may be more beneficial for microorganisms to funnel it toward catabolic processes.

In conclusion, based on 16S rDNA sequencing of selected dominant TTGE bands, no obligatory FeRB relatives were detected under the growth conditions in these experiments. While we don't exclude the existence of "unknown" or already characterized obligatory Fe(III) reducers (such as *Geobacter* and *Shewanella*) in this freshwater column, observations made in this study agree with previous culture-independent studies on microbial communities of Lake Pavin anoxic layer (Lehours et al. 2005, 2007). The ecological function of facultative Fe(III) reducers in the dissimilatory Fe(III) reduction process in many subsurface environments and particularly in anoxic freshwater column is probably underestimated. The characterization of strains isolated

from our growth conditions and able to reduce Fe(III) is currently under investigation and will lead to more information dealing with ecology and physiology of these bacterial species.

This study also fits with the hypothesis of the acetoclastic origin of methane in this layer (Lehours et al. 2005, 2007) and that FeRB may use preferentially H₂ and alternative intermediate products such as lactate or fumarate for Fe(III) reduction in the anoxic freshwater column of Lake Pavin.

REFERENCES

- Aeschbag-Hertig W, Hofer M, Kipfer R, Imboden D M, Wieler R. 1999. Accumulation of mantle gases in a permanently stratified volcanic lake (Lac Pavin, France). *Geo. Cosmo. Acta* 63:3357-3372.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43:260-296.
- Balch WE, Wolfe RS. 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl Environ Microbiol* 32:781-791.
- Bryant MP. 1972. Commentary on Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clinical Nutrition* 25:1324-1328.
- Busigny V, Jézéquel D, Louvat P, Viollier E, Michard G. 2008. Iron isotopes in Lake Pavin (French Massif Central) : A window to the Precambrian Ocean. *Eos Trans. AGU*, 89 (53), Fall Meet. Abstract PP31C-1510.
- Button DK, Schut F, Quang P, Ravonna M, Robertson BR. 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:881-891.
- Cummings DE, March AW, Bostick B, Spring S, Caccavo F Jr, Fendorf S, Rosenzweig RF. 2000. Evidence for microbial Fe(III) reduction in anoxic, mining-impacted lake sediments (Lake Coeur d'Alene, Idaho). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:154-162.
- Dobbin PS, Carter JP, García-Salamanca San Juan C, von Hobe M, Powell AK, Richardson DJ. 1999. Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiol. Lett.* 176:131-138.
- Ehrlich HL. 1996. *Geomicrobiology*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York.

- Esteve-Núñez A, Núñez C, Lovley DR. 2004. Preferential reduction of Fe (III) over fumarate by *Geobacter sulfurreducens*. J. Bacteriol. 186:2897-2899.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Hammann R, Ottow JCG. 1974. Reductive dissolution of Fe₂O₃ by saccharolytic *Clostridia* and *Bacillus polymyxa* under anaerobic conditions. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 137:108-115.
- Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiol Ecol 43:1-11.
- Hungate RE. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Methods in Microbiology 3B, pp117-132. In Norris, J. R. And E. W. Ribbons (Eds.) Academic Press, New York.
- Jardillier L, Basset M, Domaizon I, Belan A, Amblard C, Richardot M, Debroas D. 2004. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. Aquat. Microb. Ecol. 35:259-273.
- Kalver JG, Pitts SJM. 1966. In Photochemistry. pp. 783. Wiley & sons eds. New York.
- Knight V, Blakemore R. 1998. Reduction of diverse electron acceptors by *Aeromonas hydrophila*. Arch. Microbiol. 169:239-248.
- Koretsky CM, Moore CM, Lowe KL, Meile C, Dichristina TJ, Van Cappellen P. 2003. Seasonal oscillation of microbial iron and sulphate reduction in saltmarsh sediments (Sapelo Island, GA, USA). Biogeochemistry 64:179-203.
- Lehours AC, Bardot C, Thénot A, Debroas D, Fonty G. 2005. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. Appl Environ Microbiol 71 :7382-7400.
- Lehours AC, Evans P, Bardot C, Joblin K, Fonty G. 2007. Phylogenetic diversity of *Archaea* and *Bacteria* in the anoxic zone of a meromictic Lake (Lake Pavin, France). Appl Environ Microbiol 73:2016-2019.
- Lin B, Hyacinthe C, Bonneville S, Braster M, Van Cappellen P, Röling WFM. 2007. Phylogenetic and physiological diversity of dissimilatory ferric iron reducers in sediments of the polluted Scheldt estuary, Northwest Europe. Env. Microbiol. 9:1956-1968.
- Lonergan DJ, Jenter HL, Coates JD, Phillips EJ, Schmidt TM, Lovley DR. 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe (III)-reducing bacteria. J. Bacteriol. 178:2402-2408.
- Lovley DR. 1987. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. Geomicrobiol. J. 5:375-399.
- Lovley DR. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiol. Rev. 55:375-399.
- Lovley DR. 2006. The dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-reducing prokaryotes. The Prokaryotes, vol. 2 (Springerlink eds.), Springer New York. pp. 635-658.

Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Phys* 49:219-286.

Lovley DR, Phillips EJP, Lonergan DJ. 1989. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Appl Environ. Microbiol.* 55:700-706.

Lovley DR, Phillips EJP. 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:683-689.

Lovley DR, Phillips EJP. 1987. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2636-2641.

Lowe KL, Dichristina TJ, Roychoudhury AN, Van Cappellen P. 2000. Microbiological and geochemical characterization of microbial Fe(III) reduction in salt marsh sediments. *Geomicrobiol J.* 17:163-178.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, *et al.* 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acid Res.* 32:1363-1371.

Luijten ML, DeWeert J, Smidt H, Boschker HTS, deVos WM, Schraa G, Stams AJM. 2003. Description of *Sulfospirillum halorespirans* sp. nov, an anerobic tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfospirillum* as *Sulfospirillum multivorans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:787-793.

MacBeth TW, Cummings DE, Spring S, Petzke LM, Sorenson KS Jr. 2004. Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from *in situ* biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7329-7341.

Massana R, Pedrós-Alió C, Casamayor EO, Gasol JM. 2001. Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. *Limnol. Oceanogr.* 46:1181-1188.

Michard G, Viollier E, Jézéquel D., G. Sarazin. 1994. Geochemical study of a crater lake : Pavin lake, France-Identification, location and quantification of the chemical reactions in the lake. *Chem. Geol.* 115:103-115.

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.

Nierop KGJJ, Jansen B, Verstraten JM. 2002. Dissolved organic matter, aluminium, and iron interactions: precipitation induced by metal/carbon ratio, pH and competition. *Science of the Total Environment* 300:201-211.

Ottow JCG. 1970. Selection, characterization and iron-reducing capacity of nitrate reductaseless (nit-) mutants of iron-reducing bacteria. *Z. Allg. Mikrobiol.* 10:55-62.

- Park HS, Kim BM, Kim HS, Kim HJ, Kim GT, Kim M, Chang IS, Park YK, Chang HI. 2001. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe* 7:297-306.
- Postgate JR. 1984. The sulphate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Phillips E, Lovley DR, Roden EE. 1993. Composition of non-microbially reducible Fe (III) in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2727-2729.
- Roden EE, Wetzel RG. 1996. Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sediments. *Limnol. Oceanogr.* 41:1733-1748.
- Roden EE, Wetzel RG. 2003. Competition between Fe(III)-reducing and methanogenic bacteria for acetate in iron-rich freshwater sediments. *Microb Ecol.* 45:252-258.
- Röling WFM, van Breukelen BM, Braster M, Lin B, van Verseveld HW. 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl Environ Microbiol* 67:4619-4629.
- Saito M, Watanabe I. 1978. Organic matter production in rice field flood water. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 24:427-440.
- Tebo BM, Obraztsova AY. 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162:193-198.
- Van Bodegom PM, Scholten JCM, Stams AJM. 2004. Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microb. Ecol.* 49:261-268.
- Van Bodegom PM, Stams AJM. 1999. Effects of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils. *Chemosphere* 39:167-182.
- Van Kujik BLM, Schlösser E, Stams AJM. 1998. Investigation of the fumarate metabolism of the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *Arch. Microbiol.* 169:346-352.
- Van Verseveld HW, Röling WFM. 2004. Cluster analysis and statistical comparison of molecular community profile data. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. pp. 1-24.
- Venkateswaran K, Dollhopf ME, Aller R, Stackebrandt E, Nealson KH. 1998. *Shewanella amazonensis* sp. Nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:965-972.
- Viollier E, Jézéquel D, Michard G, Pèpe M, Sarazin G, Albéric P. 1995. Geochemical study of a crater lake (Pavin Lake, France): Trace-element behaviour in the monimolimnion. *Chem Geol* 125:61-72.
- Viollier E, Michard G, Jézéquel D, Pèpe M, Sarazin G. 1997. Geochemical study of a crater lake: Lake Pavin, Puy de dôme, France. Constraints afforded by the particulate matter distribution in the element cycling within the lake. *Chem Geol* 142:225-241.

Von Wintzingerode F, Selent B, Hegemann W, Göbel UB. 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:283-286.

Von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:213-229.

Weisburg W, Barns GSM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.

Zaunmüller T, Kelly DJ, Glöckner FO, Uden G. 2006. Succinate dehydrogenase functioning by a reverse redox loop mechanism and fumarate reductase in sulphate-reducing bacteria. *Microbiology* 152:2443-2453.

PRE-ARTICLE V*

Réduction dissimilatrice du Fe (III) par la souche BS2, phylogénétiquement affiliée à *Clostridium saccharobutylicum*, isolée de la zone anoxique d'un lac méromictique (Le Lac Pavin)

Résumé: Le processus de réduction dissimilatrice du Fe (III) est probablement un des principaux métabolismes bactériens se réalisant dans la zone anoxique permanente du Lac Pavin. Les premières analyses conduites *in-situ* (Article 3) et *in vitro* (Article 4) n'ont cependant pas révélé la présence de bactéries réductrices obligatoires de Fe(III). Il apparaît ainsi probable que cette voie métabolique puisse être utilisée comme processus alternatif par certains microorganismes (bactéries sulfato-réductrices ou fermentatives). Afin d'étudier la capacité des bactéries fermentatives du monimolimnion de ce lac à effectuer la réduction dissimilatrice du Fe(III) et l'avantage énergétique potentiel que peut leur conférer ce processus, la souche BS2 a été utilisée comme modèle. Cette souche, bien qu'étroitement affiliée à *C. saccharobutylicum* présente une autofluorescence naturelle qui n'a, à notre connaissance, jamais été mise en évidence chez les espèces du genre *Clostridium*.

La cinétique de consommation du glucose a été réalisée en présence et en absence de Fe (III) qui a été additionné dans les conditions de culture soit sous forme d'oxyhydroxides ferriques (OHF), soit sous forme soluble (FeNTA). La quantité d'énergie libérée a été analysée par micro-calorimétrie et les produits fermentaires détectés par résonance magnétique nucléaire et par chromatographie phase gazeuse.

Les résultats obtenus révèlent que la souche BS2 réalise la réduction dissimilatrice du Fe (III) qui est par ailleurs stimulée en présence de substances humiques, ou d'AQDS[†]. L'utilisation du substrat (glucose) est optimisée en présence de Fe(III). En effet, les rendements d'oxydation et les durées d'utilisation de ce substrat sont supérieurs en présence de Fe(III). La quantité d'énergie libérée *via* la réduction dissimilatrice du Fe(III) est également accentuée par rapport à la fermentation "classique" du glucose.

La souche BS2 constitue ainsi un bon modèle d'étude de bactéries fermentatives Gram-positives du monimolimnion du Lac Pavin pour analyser le processus de réduction dissimilatrice du Fe (III).

* Prépublication dans une forme non définitive nécessitant des compléments d'études

† AQDS : Analogue de substances humiques

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes naturels, le Fe (III) est réduit par une variété de bactéries *via* leurs métabolismes respiratoires, fermentaires ou photosynthétiques (Park *et al.* 2001). Ces microorganismes Fe (III)-réducteurs peuvent être séparés en deux groupes : ceux conservant l'énergie de la réduction du Fe (III) pour leur croissance et ceux ne présentant pas cette capacité (Lovley 2003). Ainsi, les espèces bactériennes appartenant aux genres *Geobacter* (Lovley *et al.* 1993, Caccavo *et al.* 1996), *Shewanella* (Lovley *et al.* 1989, Hyun *et al.* 1999), et l'espèce sulfato-réductrice *Desulfotomaculum reducens* (Tebo et Obraztsova 1998) sont capables de conserver l'énergie du transfert d'électrons pour leur croissance, en couplant l'oxydation d'acides organiques, d'hydrocarbures aromatiques et d'H₂ à la réduction du Fer (III) (Lovley *et al.* 2003, Park *et al.* 2001). Parmi le second groupe de microorganismes ferro-réducteurs, certaines espèces croissent *via* des métabolismes fermentaires et peuvent utiliser le Fe (III) comme accepteur mineur d'électrons durant la fermentation (Lovley 2003). La croissance de ces bactéries fermentatives étant possible en l'absence de Fe (III), ces dernières ne sont donc pas inféodées à la réduction dissimilatrice de cet élément. Il est d'autre part classiquement considéré que la majorité des équivalents électrons de substrats fermentés sont retrouvés dans les produits de fermentation et que moins de 5% de ces équivalents réduits sont transférés au Fe (III) (Lovley 1987, Lovley et Phillips 1988, Lovley 2003). Il est néanmoins présumé que les microorganismes utilisant le Fe (III) comme accepteur d'électrons au cours de la fermentation présentent un avantage thermodynamique en comparaison des bactéries strictement fermentatives (Lovley et Phillips 1989).

Dans cette étude, la capacité de la souche BS2, isolée de la zone anoxique du Lac Pavin à réduire le Fe (III) *via* l'oxydation du glucose a été analysée. L'efficacité énergétique (et donc l'avantage compétitif potentiel) conféré par ce processus a été comparée à celle résultant de l'oxydation du glucose seul. La présence de substances humiques pouvant significativement stimuler la réduction du Fe (III) (Lovley *et al.* 1996, 1998), l'influence de ces dernières a également été analysée.

MATERIEL ET METHODES

Origine du microorganisme : La souche BS2 a été isolée à partir d'échantillons d'eau sédimentaire superficielle (interface eau/sédiment) du Lac Pavin. Le carottage a été réalisé, à la verticale de l'isobathe 92 m, correspondant à la profondeur maximale du Lac, à l'aide d'un carottier multiple Jenkin-Mortimer selon le protocole précédemment décrit par Mallet et Debroyas (2000). L'échantillon d'eau a été transféré dans une bouteille stérile, et placé sous une atmosphère N₂.

Conditions de culture : Les méthodes d'isolement de microorganismes Fe (III)-réducteurs des sédiments marins ou côtiers ont été décrites en détail dans de nombreuses publications (**Lovley 1987, 1991, 1995**). Les méthodes de culture anaérobie ont été utilisées sur l'ensemble de cette étude (**Hungate 1969**) : les milieux de culture ont été préparés sous atmosphère CO₂, et les transferts (liquide↔solide) ont été réalisés sous la même atmosphère gazeuse.

Le milieu minimum (LM) est composé de : KCl (0.6 g), NaCl (0.6 g), MgSO₄ (0.5 g), CaCl₂ (0.1 g), NH₄Cl (0.54 g), tampon PIPES (1.5 g), solution de vitamines de Balch (10 ml, **Balch et al. 1979**), solution d'oligoéléments de Balch (10ml, **Balch et al. 1979**), Résazurine 0.1 % (1 ml), Hémine 0.1 % (1 ml), Tryptone (1 g), extrait de levure (0.5 g), eau distillée Qsp. 1000 ml. Le pH a été ajusté à 6.8, et après d'ébullition (10 minutes) et refroidissement sous CO₂ (jusqu'à 60°C), 5 g de NaHCO₃ et 0.7 g de Cystéine-sulfure-HCl ont été ajoutés. Le milieu a été dispensé en conditions anaérobies dans des tubes de Hungate, fermés avec des bouchons butyle. Les milieux solides pour l'isolement de la souche ont été préparés en additionnant 15g.l⁻¹ au milieu LM. Deux formes ferriques, préparées selon le protocole décrit par **Lovley (2003)** ont été supplémentées dans les milieux de culture. Le fer ferrique est introduit soit sous forme insoluble [oxyhydroxyde de Fe (III), (OHF) **Lovley et Phillips 1988**] soit sous forme de complexe soluble [Fe-nitrilotriacétate, Fe-NTA, **Coates et al. 1996**]. Les cultures en batch ont été réalisées avec addition de D (+)-glucose (0.05M), ou de D (+)-glucose (0.05M) et oxyhydroxyde de Fe (III) (7.5 mM), ou de D (+)-glucose (0.05 M) et FeNTA (7.5 mM) et ont été incubées à 25°C. Pour chaque condition de culture, des duplicats et des témoins sans bactéries ont été réalisés. Ces résultats, ont été répétés dans une seconde expérience en se plaçant dans les mêmes les conditions de croissance [BS2+ glucose, BS2+ glucose+OHF] mais dans des volumes finaux de 60 ml. L'influence potentielle des substance humiques sur la réduction du Fe (III) a été analysée sur des cultures BS2 en additionnant 0.5 g.l⁻¹ d'acides humiques (Aldrich) ou de l'analogue d'acides humiques, le 9,10-Anthraquinone-2,6-disulfonic acid disodium salt (AQDS, Sigma).

Caractérisation morphologique :

♦ Préparation et observation des échantillons en microscopie électronique à balayage (MEB), (selon la méthode P. Lejeune) : La fixation de l'échantillon (soit sur filtre, soit sur des cultures en suspension) est réalisée par immersion (2 heures) dans une solution de glutaraldéhyde (1.3%) en tampon cacodylate (0.07M, pH 7.4) additionné de rouge de Ruthérium (0.05%). L'échantillon est rincé avec un tampon cacodylate (0.07M) additionné de rouge de Ruthérium (0.05%) puis post-fixé avec une solution de tétroxyde d'osmium (OsO₄, 1%) dans le tampon cacodylate (0.07M, pH 7.4) pendant 1 heure à l'obscurité. Au terme de cette post-fixation, l'échantillon est lavé 3 fois en eau

PPI[‡], puis déshydratés en bain d'éthanol de force croissante, 50°, 70°, 90° et 3 bains d'éthanol absolu. Le dernier alcool absolu est substitué par un mélange volume à volume éthanol 100°-Héxaméthoxylinedisilane (HMDS), puis dans une solution d'HMDS pur. Après évaporation à température ambiante sous hotte, l'échantillon sec est métallisé avec du platine par pulvérisation cathodique (couche de 5 nm environ). L'échantillon est observé avec un microscope à balayage doté d'un canon à émission de champ (Zeiss Gemini 982), les électrons du faisceau sont accélérés sous une tension de quelques kilovolts (1 à 15 KV), l'échantillon est soumis à un vide de 10⁻⁷ hPa. Les images sont numérisées en ligne avec une résolution de 1024x1024 pixels.

◆ Préparation et observation des échantillons en microscopie électronique à transmission (MET), selon la méthode P. Lejeune: Les cellules sont fixées dans du glutaraldéhyde 1.3% en tampon cacodylate (0.07M, pH 7.4) et rouge de Ruthérium (0.05%, pH 7.4). Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé plusieurs fois en tampon cacodylate (0.07 M) et rouge de Ruthérium (0.05%) et post-fixé dans une solution de tétr oxyde d'osmium 1% en tampon cacodylate 0.07M. Le culot est déshydraté par des bains d'alcool éthylique croissant (50, 70, 90, 100) puis deux bains d'oxyde de propylène et enfin un bain volume à volume d'oxyde de propylène et épon, puis imprégné une nuit dans l'épon pur. Le culot est inclus en épon et polymérisé à 60°C pendant 48 heures. Les coupes ultra-fines sont réalisées sur un ultra-microtome Ultracut E. Reichert. Les coupes contrastées par une double imprégnation acétate d'uranyle/citrate de plomb sont observées avec un microscope électronique à transmission JEOL 1010 ou 1230 sous une tension d'accélération de 80 à 120 KV.

◆ Détermination de la structure Gram⁺ de la paroi: La coloration de Gram a été réalisée avec le kit de coloration DIFCO (Crystal violet (1min), Iodine stabilisée (1 min), Décolorant (1/3 acétone, 2/3 isopropanol, 20 s), safranine (1 min). L'observation a été effectuée sur un microscope optique Leica, modèle DM IRB sous grossissement x1000.

◆ Coloration au DAPI et observation de l'auto fluorescence naturelle: 1.96 ml de culture ont été fixés avec 3% de glutaraldéhyde (vol/vol) et filtrés sous vide (p = 100 mbar) sur membranes noires en polycarbonate, de porosité 0.2 µm (type GTBP, 25 mm diamètre, Millipore). Les filtres ont été incubés 20 minutes dans du DAPI (5 µg.l⁻¹) à l'obscurité, puis rincés avec 30 ml d'eau distillée (ED) stérile. Les filtres, séchés à l'obscurité sur papier Whatman, ont été placés entre lames et lamelles dans de l'huile à immersion Olympus (nd = 1,516 ; 23°C, sans fluorescence). Les observations ont été réalisées en microscopie à épifluorescence (x1000) sous filtres UV (modèle

[‡] PPI : pour préparation injectable

DMIRB, Leica). L'autofluorescence des microorganismes a été révélée sous filtres verts ($\lambda = 515-560$ nm) et bleus ($\lambda = 450-490$ nm).

Séquençage du gène ARNr16S et analyses phylogénétiques : 2 ml de culture ont été centrifugés (20 min, 6000 rpm) et l'extraction d'ADN génomique à partir de la biomasse bactérienne contenue dans le culot a été réalisée selon un protocole précédemment décrit (**Ausubel *et al.* 1983, Jardillier *et al.* 2004**) Les amplifications PCR ont été réalisées en utilisant les amorces 27f (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG, **Cottrell and Kirchman 2000**) et 1492r (GGT TAC CTT GTT ACG ACT, **Humayoun *et al.* 2003**) sur un thermocycleur modèle PTC-200 cyler (MJ research) selon le programme suivant : préchauffage à 95 °C pendant 5 min, suivi par 30 cycles consistant en dénaturation (1 min à 95 °C), hybridation (1 min à 55 °C), élongation (1 min à 72 °C) et une élongation finale à 72°C pendant 10 min. Les produits d'amplification ont été purifiés sur colonne "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) et directement séquencés à partir des amorces 27f et 1492r par la société MWG Biotech (Roissy-Charles de Gaulle, France). La séquence a été comparée avec les banques de données EMBL et Genbank en utilisant le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, **Altschul *et al.* 1990**) pour déterminer son affiliation phylogénétique approximative. Un positionnement plus précis a été réalisé avec le logiciel ARB et sa banque de données associée (**Ludwig *et al.* 2004**), après alignement et corrections manuelles en prenant en considération la structure secondaire de l'ADNr16S.

Dénombrement des cellules : 1,94 ml de culture cellulaire ont été fixés avec 3% (vol/vol) de glutaraldéhyde 25%, les échantillons ont été immédiatement congelés à -80°C et conservés à cette température jusqu'à l'analyse. 50 µl de la culture cellulaire fixée ont été dilués au 1/2 dans de l'eau distillée préalablement filtrée sur 0.2 µm. 50 µl de cette dilution ont été placés dans un tube contenant 440 µl d'eau distillée préalablement filtrée sur 0.02µm, 5 µl de SYBR Green (concentration finale 10^{-4} M) et 5 µl de microbilles (FlowCheck-Polysciences, densité finale 2.5×10^3). Les densités cellulaires ont été déterminées sur un cytomètre en flux modèle BD FACS Calibur, dans les conditions suivantes : vitesse moyenne, FSC E02, filtre FL1, voltage 500 V avec un seuil de 200 V, et un temps d'analyse de 1 min par échantillon.

Procédures analytiques : La concentration en glucose a été déterminée avec le Kit D-Glucose (Boehringer Mannheim). Le Fe (II) a été analysé par la méthode à l'orthophénantroline (**Kalver et Pitts 1966**) et dosé par spectrophotométrie à 510 nm. Les composés issus de la fermentation (AGCC[§]) ont été analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton sur un

§ AGCC : Acides gras à courtes chaînes

appareillage RMN 400 MHz, permettant sur un seul spectre de visualiser l'ensemble des AGCC. L'étalon interne est le TSPD4 (10 mM) et le temps de relaxation est de 190 secondes (16 Scan). La quantification a été réalisée sur le logiciel Xwinnmr 2.6. Les gaz produits lors de la fermentation ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse, sur un chromatographe DI700 (Delsi Instrument). L'injecteur et la colonne de séparation (colonne supelco Carboxen 1000) sont chauffés à 100°C. Le gaz vecteur est l'argon et la détection est réalisée par catharométrie.

Les échantillons destinés à l'analyse calorimétrique sont préparés dans des ampoules en verre de 4 ml munies de septum en butyle recouvert de téflon sur la face inférieure et serties avec des capsules aluminium (Figure S.1**). La préparation de ces échantillons est réalisée en conditions anaérobies. Les ampoules sont placées dans un calorimètre Thermal Activity Monitor (TAM 2277, Thermometric, Suède, Figure S.2). Sa sensibilité permet de détecter des effets thermiques inférieurs au microwatt, la limite se situant autour de quelques nanowatts (gamme de travail : de 3 à 3000 μ W). Les mesures sont réalisées à 25°C.

RESULTATS

I. SOUCHE BS2

1- Isolement de la souche BS2 et caractérisation morphologique:

Un isolat BS2 a été sélectionné à partir de colonies Fe (III)-réductrices sur un milieu gélosé contenant du glucose comme donneur d'électrons. Ces colonies ont été prélevées et transférées dans le milieu LM liquide contenant du glucose et du Fe (O)OH insoluble, respectivement comme donneur et accepteur d'électrons. Les cellules BS2 forment des bâtonnets (Bacille) dont la longueur moyenne en culture est de 5 μ m (Figure 3), et le diamètre moyen de 0.7 μ m. La présence de flagelles n'a pas été détectée. Les analyses réalisées en microscopie électronique à transmission mettent bien en évidence la formation de spores sub-terminales caractéristiques du genre *Clostridium* (Figure 1). Les cellules BS2 présentent une coloration Gram-positive. Une des particularités remarquables de cette souche BS2 est l'émission d'une fluorescence observée sous excitation dans les longueurs d'onde comprises entre 515-560 et entre 450-490 nm (Figure 2).

** S.1 et S.2 : Figures présentées en Matériel supplémentaire à la fin du chapitre

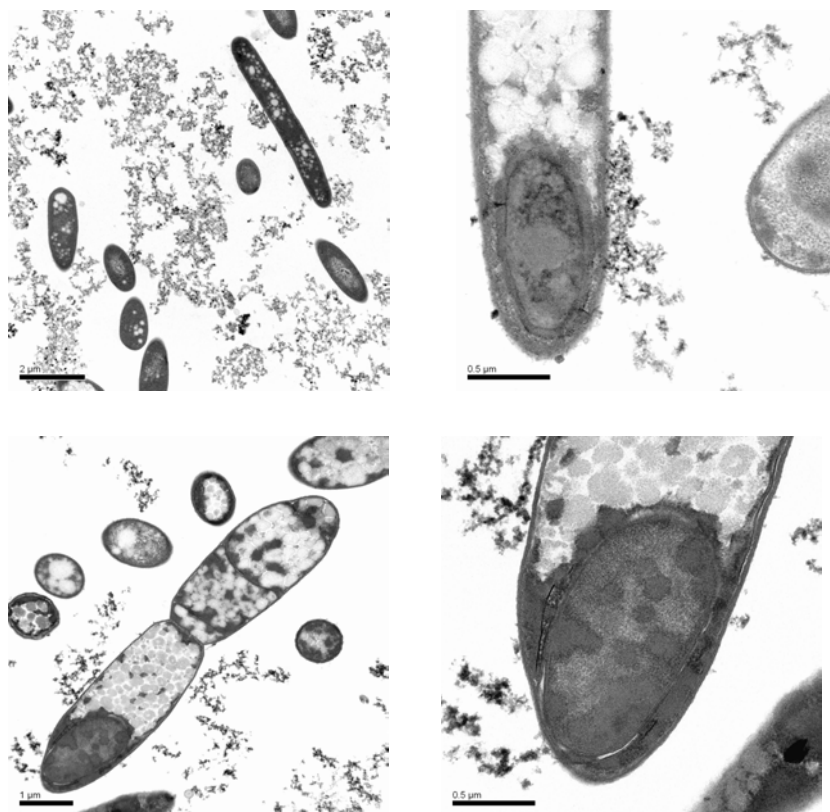


Figure 1: Photos en Microscopie électronique à transmission de la souche BS2 après 20 heures de croissance dans le milieu LM+glucose +oxyhydroxydes ferriques insolubles (Observations à partir de cultures en suspension)

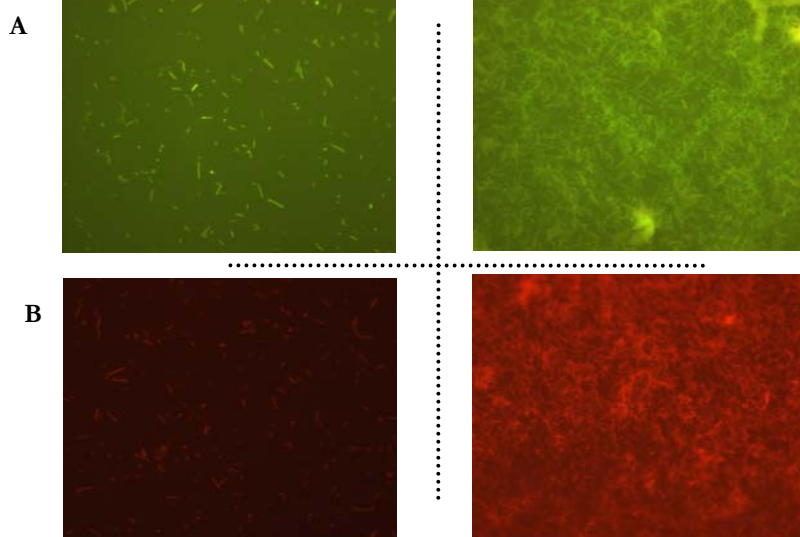


Figure 2: Auto fluorescence des cellules BS2 révélée sous excitation dans les longueurs d'onde 515-560 nm (A) et 450-490 nm (B).

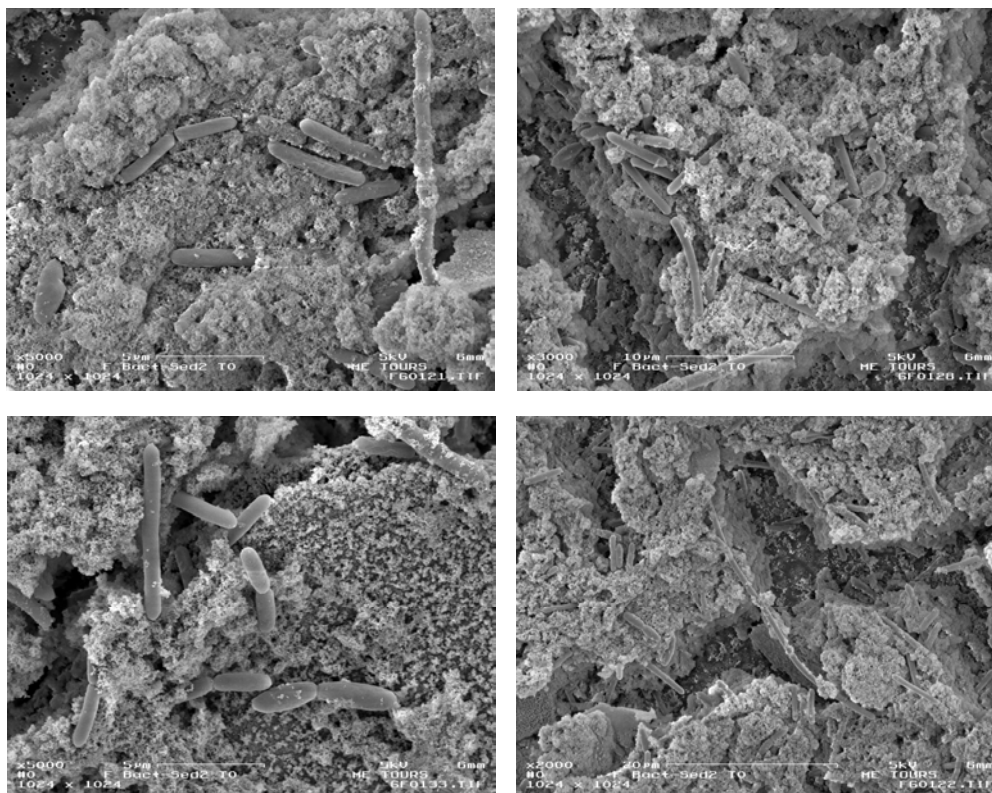


Figure 3A: Photos en Microscopie électronique à balayage de la souche BS2 après 20 heures de croissance dans le milieu LM+glucose +oxyhydroxydes ferriques insolubles (Observations à partir de cultures sur filtres)

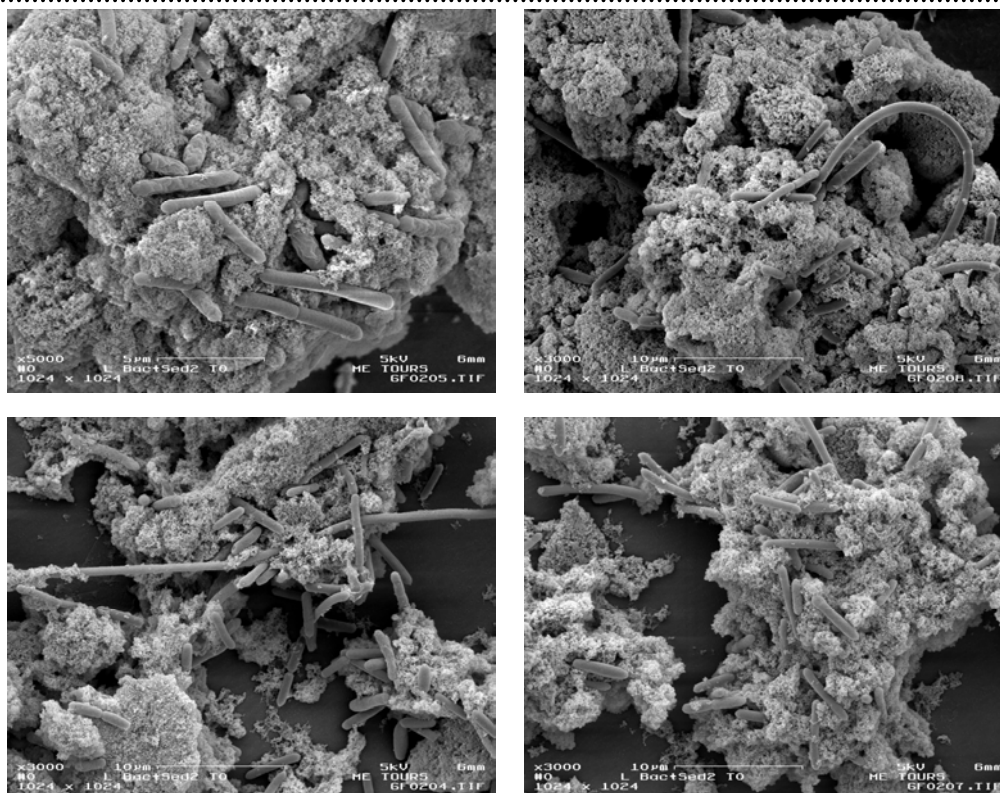


Figure 3B: Photos en Microscopie électronique à balayage de la souche BS2 après 20 heures de croissance dans le milieu LM+glucose +oxyhydroxydes ferriques insolubles (Observations à partir de cultures en suspension)

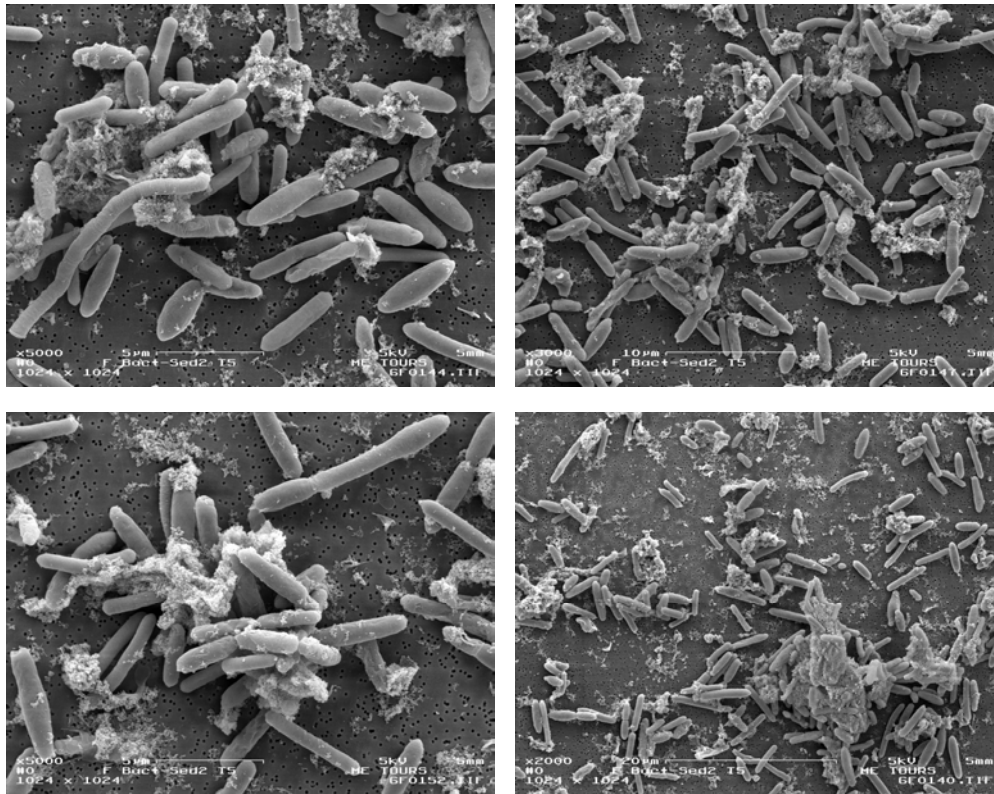


Figure 4A: Photos en Microscopie électronique à balayage de la souche BS2 après 120 heures de croissance dans le milieu LM+glucose +oxyhydroxydes ferriques insolubles (Observations à partir de cultures sur filtres)

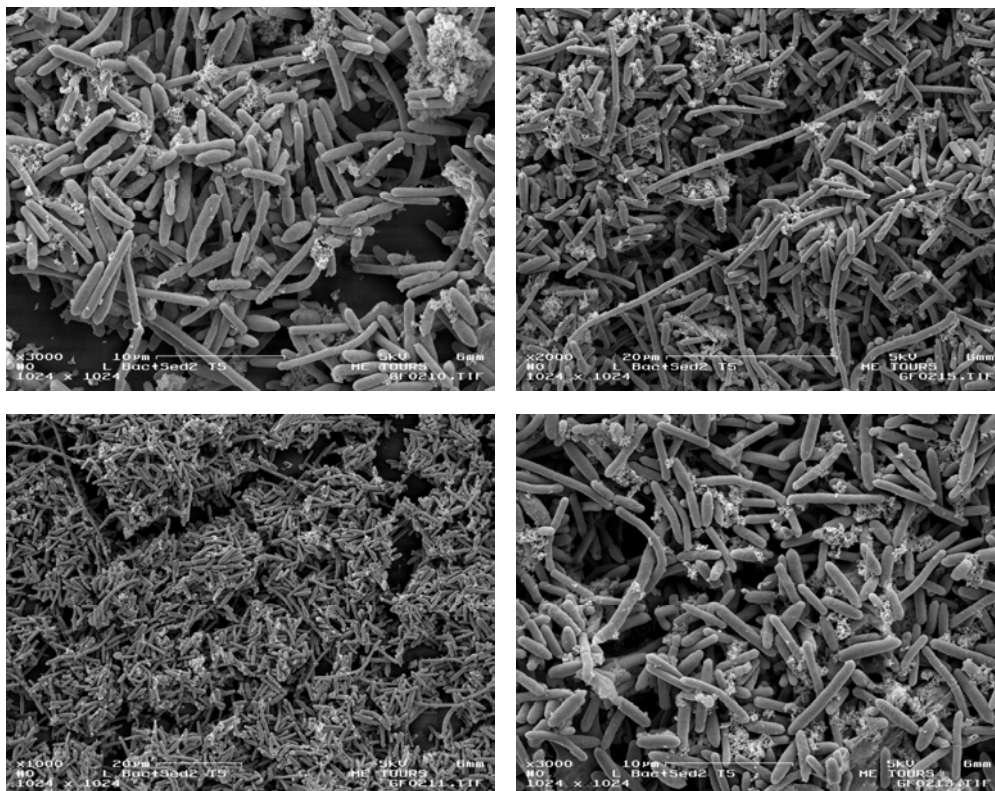


Figure 4B: Photos en Microscopie électronique à balayage de la souche BS2 après 120 heures de croissance dans le milieu LM+glucose +oxyhydroxydes ferriques insolubles (Observations à partir de cultures en suspension)

2- Positionnement phylogénétique de la souche BS2

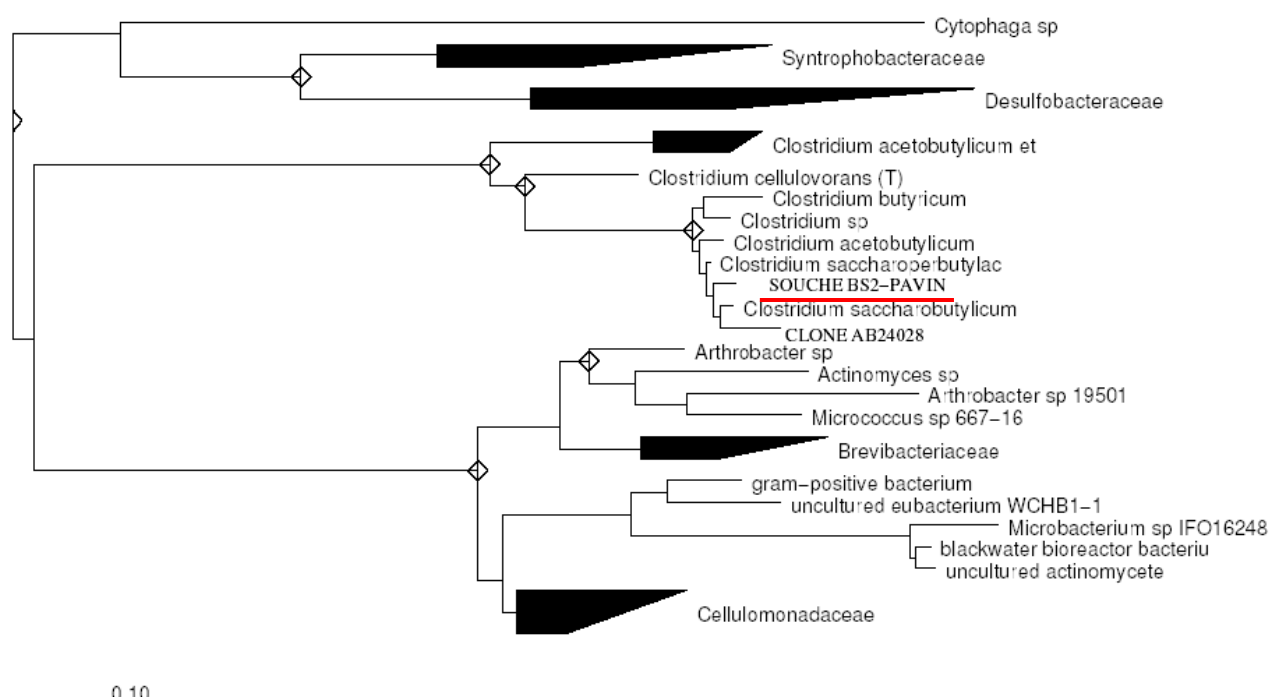


Figure 5: Positionnement phylogénétique de l'isolat BS2. L'arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences ARNr16S. L'échelle représente le nombre présumé de changements par position sur la séquence.

L'affiliation phylogénétique de la souche BS2 (Figure 5) confirme son appartenance aux *Clostridiaceae*, au sein du phylum des Firmicutes. L'espèce cultivée la plus proche étant *Clostridium saccharobutylicum*.

II. AVANTAGES ENERGETIQUES DE LA REDUCTION DISSIMILATRICE DU Fe(III)

1- Evolution des concentrations en Fe (II) et glucose

Après 20 heures de croissance dans le milieu LM en présence de glucose (G) et d'oxyhydroxydes ferriques (OHF) insolubles (Figures 3A et 3B), les cellules BS2 présentent une quasi-inclusion au sein des particules ferriques. Après 120 heures, les cristaux de Fe (III) ont quasiment disparu, résultat d'une réduction du Fe (III) et donc d'une solubilisation de ce dernier (Figures 4A et 4B). La réduction du Fe(III) dans les cultures supplémentées en OHF est rapide, en effet après 19 heures, la concentration en Fe (II) a été doublée dans les cultures en batch de 10 ml (T0 : 2.1 mM, T+19h : 4.8 mM, Figure 7.B) et triplée après 36 heures dans les batch de 60 ml (T0 : 2.07±0.16 mM, T+36h : 6.6±0.5 mM, Figure 7.C). Dans les cultures supplémentées en FeNTA, la réduction du Fe (III) est plus lente et le doublement des concentrations en Fe(II) n'est

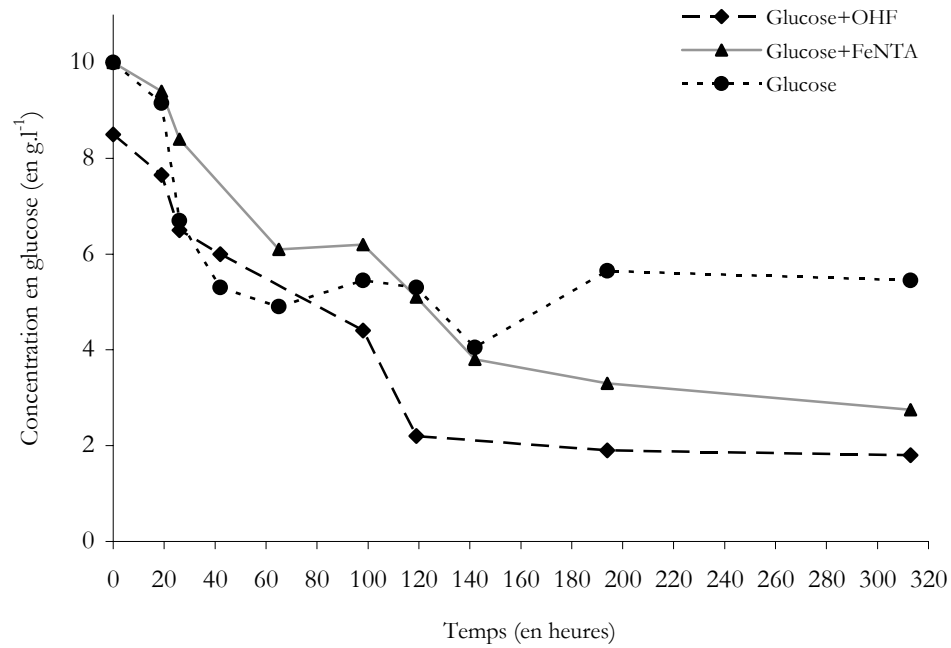
EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN GLUCOSE (EN g.l⁻¹)

Figure 6.A: Evolution des concentrations en glucose dans la culture BS2 en batch de 10 ml. Les témoins axéniques ne sont pas représentés car aucune évolution des concentrations en glucose n'a été observée.

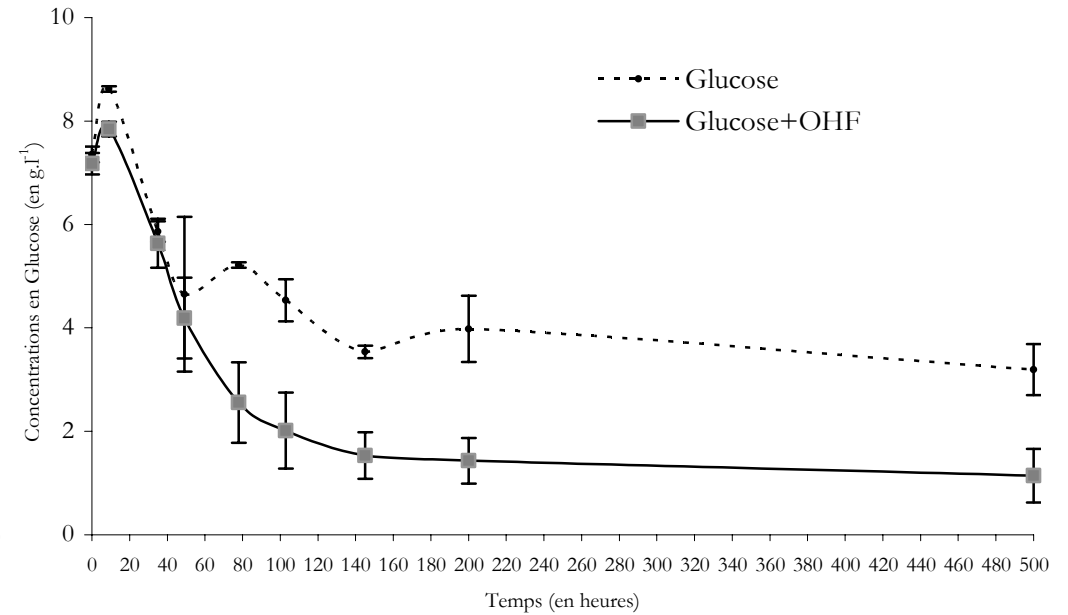


Figure 6.B: Evolution des concentrations en glucose dans la culture BS2 en batch de 60 ml. Les témoins axéniques ne sont pas représentés car aucune évolution des concentrations en glucose n'a été observée.

EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN FeII (EN mM)

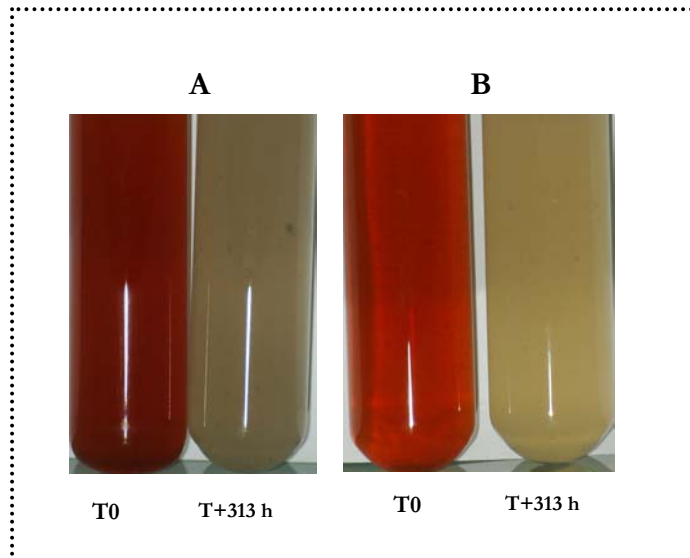


Figure 7.A: Observations des cultures BS2 :(A) Glucose+OHF, (B) Glucose+FeNTA au temps initial et après 313 heures de croissance. La décoloration est le résultat d'une réduction du Fe(III) en ions Fe (II) solubles et incolores.

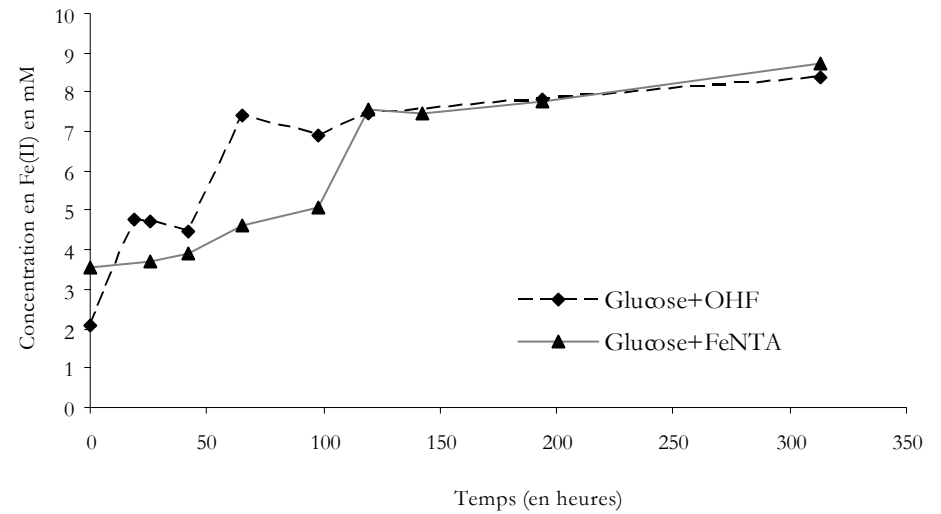


Figure 7.B: Evolution des concentrations en Fe(II) dans la culture BS2 en batch de 10 ml. Les témoins axéniques ne sont pas représentés car aucune évolution des concentrations en glucose n'a été observée.

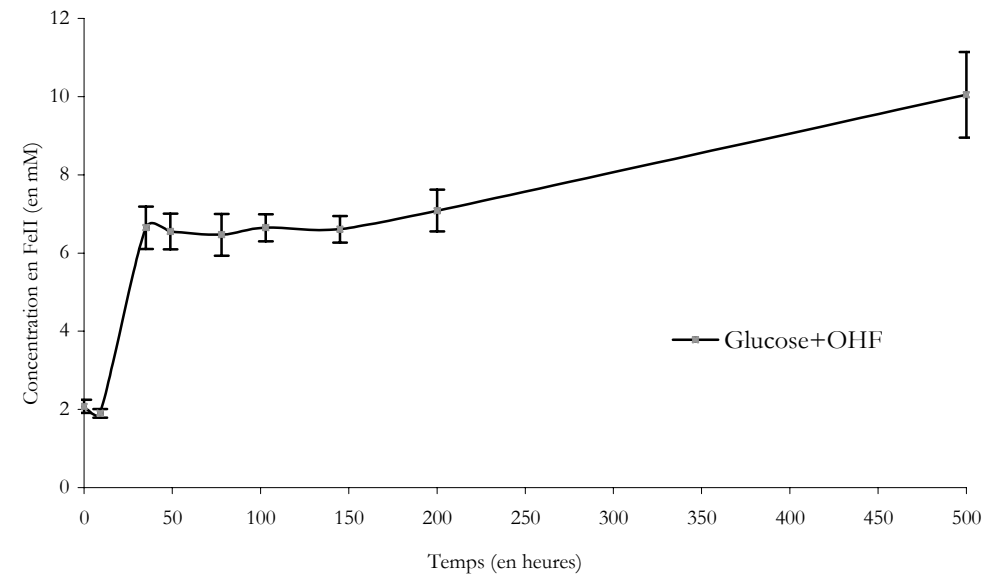


Figure 7.C: Evolution des concentrations en Fe(II) dans la culture BS2 en batch de 60 ml. Les témoins axéniques ne sont pas représentés car aucune évolution des concentrations en glucose n'a été observée.

noté qu'après 120 heures de croissance (Figure 6.A). Paradoxalement, l'évolution de la consommation de glucose est similaire dans ces deux conditions de culture, les pentes des courbes représentant l'évolution des concentrations en glucose étant de -0.024 et -0.022 respectivement dans les cultures BS2+Glucose+FeNTA et BS2+Glucose+OHF (Figure 6.A) .

Dans les cultures supplémentées en Fe(III), sous forme soluble ou insoluble, l'utilisation du substrat est optimisée (Figure 6.A et 6.B). En effet, après 313 heures d'incubation les rendements sont respectivement de 45% pour BS2+Glucose, de 79% sur BS2+Glucose+OHF et de 73% sur BS2+Glucose+FeNTA dans les batch de 10 ml (Figure 6.A). Dans l'expérience conduite en batch de 60 ml, des résultats identiques sont observés. Après 500 heures de croissance, 84% du glucose a été consommé dans les cultures supplémentées en OHF, alors que dans le même temps seulement 56% du glucose a été métabolisé dans les milieux dépourvus de Fe(III) (Figure 6.B).

2- Analyse des densités cellulaires par cytométrie en flux.

Les cellules BS2 présentant une autofluorescence naturelle (Figure 2), les échantillons ont été analysés avec et sans marquage au SYBR Green. Les résultats présentés Figure 8 mettent en évidence le déplacement du "nuage de point" R2 sur l'axe FL1-H (correspondant à l'intensité de la fluorescence). Ce déplacement est la résultante d'une fluorescence cellulaire accrue après marquage au SYBR Green. D'autre part, dans les milieux axéniques, un nuage (R4) est observé, ce dernier est également noté dans les milieux avec bactéries mais sans SYBR Green. L'interprétation de ces observations est extrêmement délicate. L'hypothèse d'une interférence du fer dans les analyses ne peut être envisagée car le nuage R4 est observé également dans les conditions de culture sur glucose seul (Figure 8). D'autre part, si un composant du milieu était détecté par l'analyse, il devrait théoriquement être également observé dans les milieux BS2+SYBR Green.

Les densités cellulaires observées après 313h (batch de 10 ml) ou 500 h (batch de 60 ml) d'incubation dans les conditions glucose seul ou glucose et Fe (III) sont sensiblement les mêmes ($2 \cdot 10^8 \text{ cell.ml}^{-1}$, Figure 9).

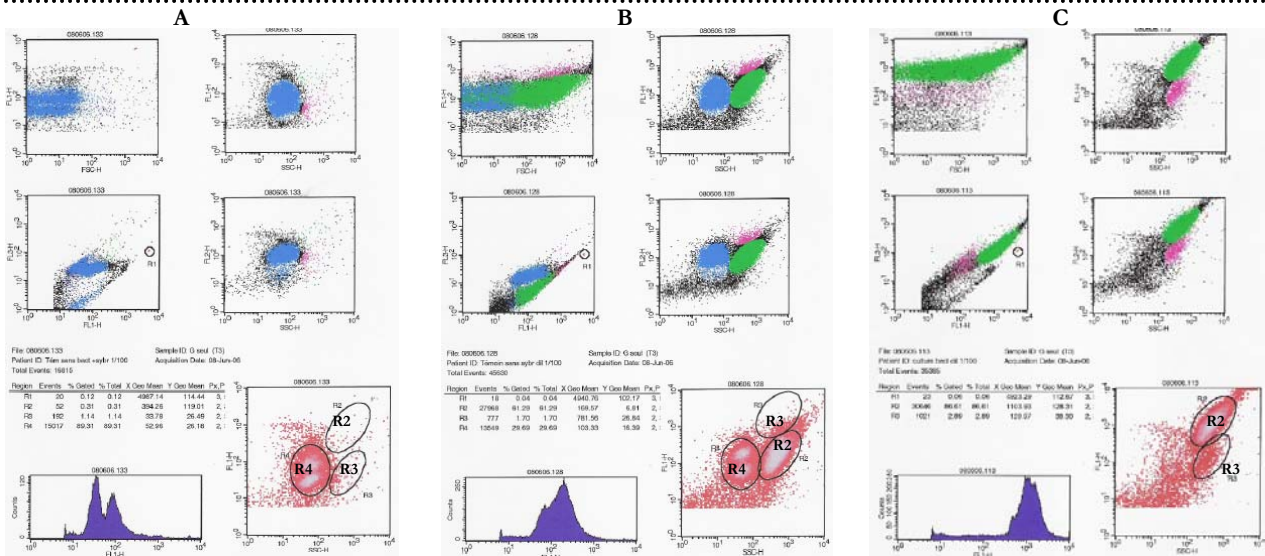


Figure 8.A: Exemple de résultats obtenus par cytométrie en flux pour les cultures BS2+ glucose seul. (A) témoin axénique avec SYBR Green, (B) culture BS2 sans SYBR Green, (C) culture BS2 avec SYBR Green après 42 heures d'incubation.

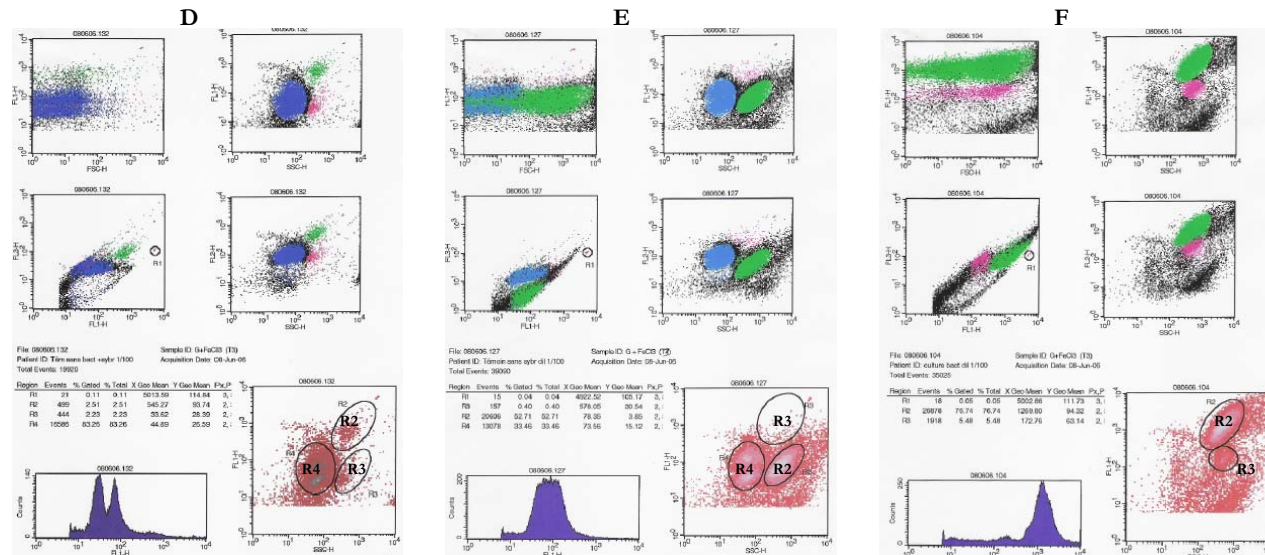


Figure 8.B: Exemple de résultats obtenus par cytométrie en flux pour les cultures BS2+ glucose+FeCl₃. (D) témoin axénique avec SYBR Green, (E) culture BS2 sans SYBR Green, (F) culture BS2 avec SYBR Green après 42 heures d'incubation.

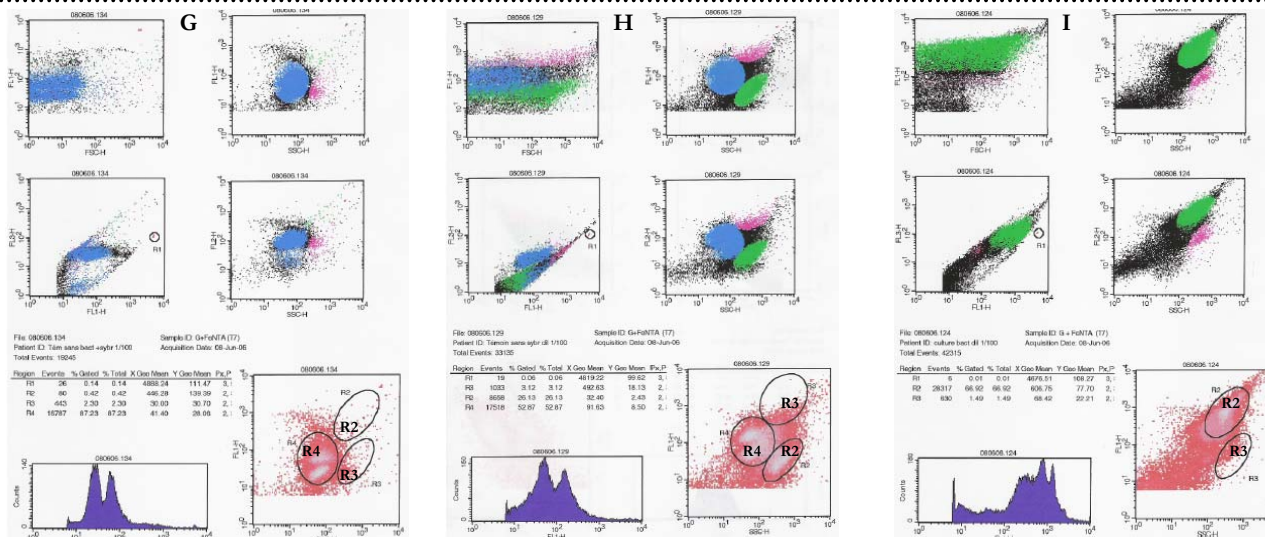


Figure 8.C: Exemple de résultats obtenus par cytométrie en flux pour les cultures BS2+ glucose+FeNTA. (G) témoin axénique avec SYBR Green, (H) culture BS2 sans SYBR Green, (I) culture BS2 avec SYBR Green après 42 heures d'incubation.

EVOLUTION DES DENSITES CELLULAIRES

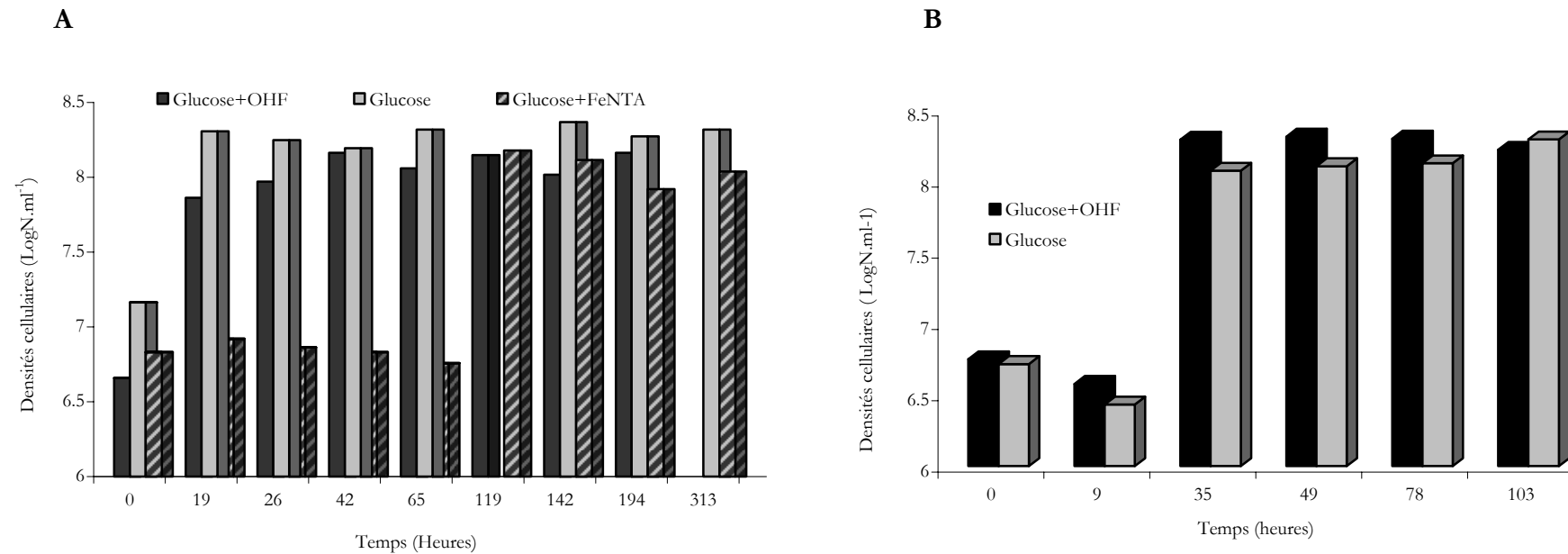


Figure 9: Evolution des densités cellulaires dans les cultures BS2 en batch de 10 ml (A) ou de 60 ml (B) exprimées en logarithme de la densité. Les témoins axéniques ne sont pas représentés car aucune cellule n'a été détectée.

3- Etudes thermodynamiques

Afin d'analyser la signification énergétique des observations reportées ci-dessus, une étude thermodynamique a été entreprise en calorimétrie (Figure S.1 et S.2). Les premières mesures avaient pour objectif de déterminer l'influence de la densité cellulaire sur la quantité de chaleur dégagée. Les résultats reportés Figure 10 de l'intégration de l'aire révèle que la quantité de chaleur produite n'est pas fonction de la densité cellulaire. Cette observation est primordiale pour la reproductibilité des études ultérieures. Les mesures calorimétriques sur les cultures BS2 en présence et en absence de Fe (III) ont été secondairement réalisées. Deux exemples de thermogrammes sont présentés Figure 11 A et 11B. Ces derniers représentent les deux cas extrêmes observés au cours des différentes mesures répétées. La reproductibilité de ces mesures thermodynamique n'est jamais absolue car de nombreux paramètres sont susceptibles d'influer sur la quantité de chaleur dégagée (état physiologique des cellules, forme des oxydes ferriques, *etc.*). Néanmoins deux observations ont été systématiquement reportées sur quatre expériences indépendantes. En présence de glucose+OHF, la quantité de chaleur dégagée est 2 à 3 fois supérieure (un cas extrême où chaleur 20 fois supérieure, Figure 11B) à celle obtenue en présence de glucose seule. La deuxième observation qui confirme les observations des cinétiques de consommation du glucose est que cette dernière est optimisée dans le temps par les cellules BS2 en présence de OHF. Après 48 heures un retour à la ligne de base (0) est observé pour les cellules BS2 en croissance sur glucose seul. Lorsque des oxyhydroxydes ferriques sont supplémentés au milieu de culture, un dégagement de chaleur est noté pendant plus de 140 heures.

4- Métabolites issus de la fermentation du glucose

Les produits issus de l'oxydation du glucose ont été analysés par RMN après 300 heures de croissance de la souche BS2.

Métabolites fermentaires détectés	BS2+Glucose	BS2+Glucose+OHF
H ₂	+ (27%PG)	+ (30%PG)
CO ₂	+	+
Acétate	+ (10.2 mM)	-
Lactate	+ (9.4 mM)	-
Butyrate	+ (24.3 mM)	-
Formate	+ (18.2 mM)	-

Tableau 1 : Métabolites fermentaires détectés dans les cultures BS2 après 300 heures de croissance sur glucose en présence ou en absence de Fe(III). La quantité d'H₂ est exprimée en pourcentage de la phase gazeuse totale (PG).

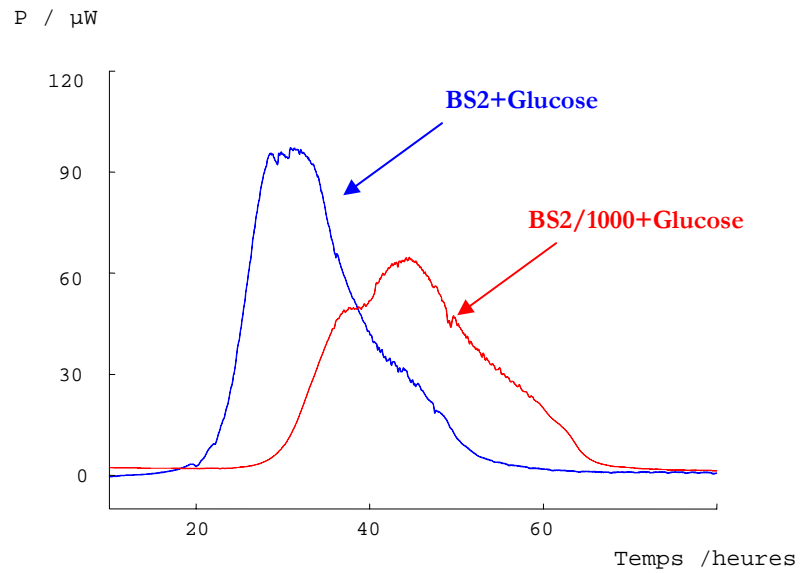


Figure 10 : Thermogrammes obtenus sur des cellules BS2 en croissance sur glucose. Densités cellulaires de 10^8 (courbe bleue), de 10^5 (courbe rouge). L'intégration de l'aire révèle que les quantités de chaleur sont identiques (5,5 J)

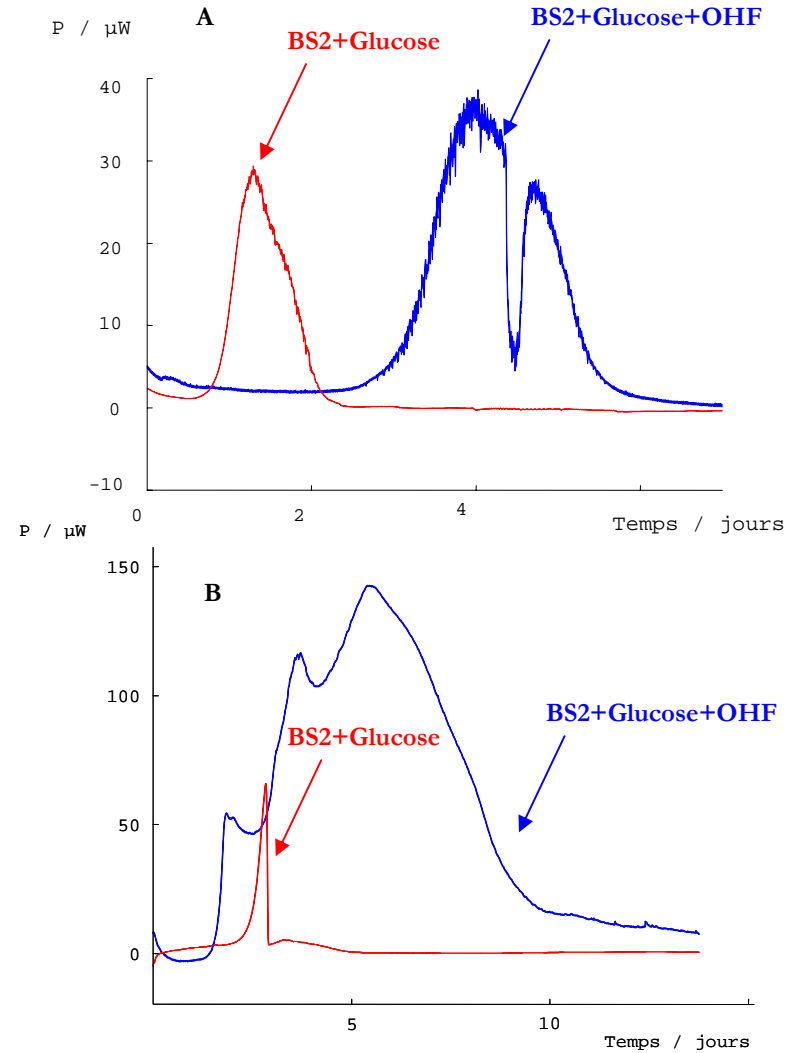
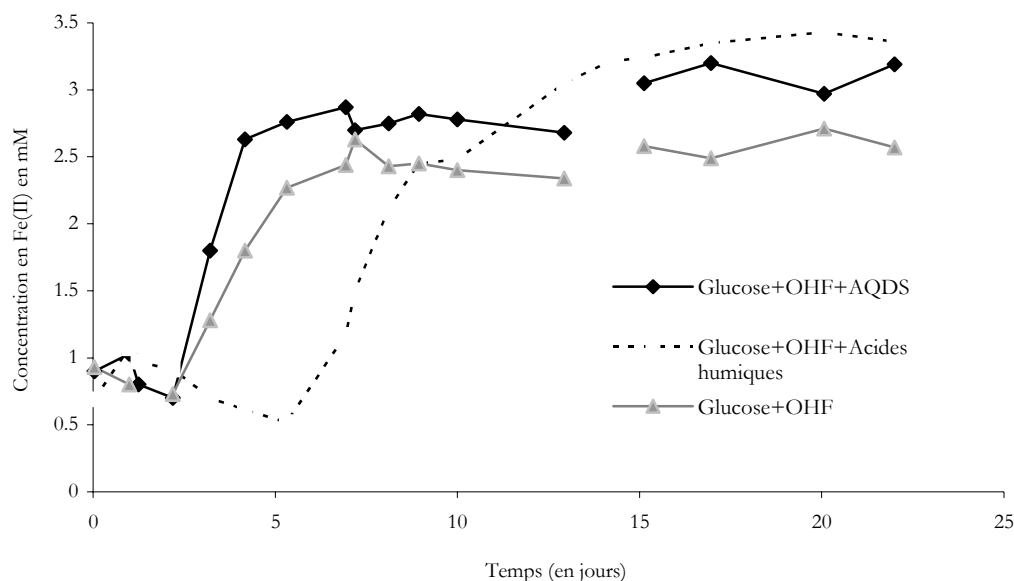


Figure 11 : Thermogrammes obtenus sur des cellules BS2 en croissance sur glucose en présence ou absence de OHF. L'intégration des aires révèle que la quantité d'énergie est de (A) 2J sur glucose seul, 5J sur glucose +OHF. (B) 3J sur glucose seul, 60J sur Glucose +OHF.

II. RÔLE POTENTIEL DES SUBSTANCES HUMIQUES DANS LA RÉDUCTION DU Fe(III)



L'addition d'acides humiques ou de l'analogue AQDS stimule la réduction du Fe(III) dans les cultures BS2. En effet, en présence d'acides humiques, 72% du Fe(III) est réduit en 22 jours, 69% du Fe(III) est réduit en présence d'AQDS et 55% du Fe(III) est réduit lorsque les OHF sont supplémentés seuls.

DISCUSSION

Dans cette étude la capacité de la souche BS2, isolée de la zone anoxique du Lac Pavin, à réduire le Fe (III) et l'efficacité énergétique potentielle que peut lui procurer cette voie métabolique alternative ont été analysées. Des concentrations croissantes en Fe (II) concomitantes à une consommation de glucose et à un accroissement des densités cellulaires ont été notés dans les cultures BS2 supplémentées en OHF ou FeNTA. Cette souche présente néanmoins la capacité de croître *via* la fermentation du glucose seul, et n'est donc pas inféodée à la réduction du Fe (III). Ces observations peuvent conduire à s'interroger sur l'origine directe ou indirecte de cette réduction. Des études antérieures réalisées sur des souches fermentaires (ex : *Clostridium butyricum*) ont révélé que la réduction du Fe (III) était la résultante d'une activité enzymatique et non de la sécrétion par ces souches de métabolites fermentaires ou d'un abaissement du pH et du potentiel redox *via* l'activité microbienne (De Castro et Ehrlich (1970), Munch et Ottow 1983, Lovley 1987, 1992).

La conséquence métabolique de l'activité Fe(III)-réductase observée chez les espèces fermentatives est une modification de la balance fermentaire et une augmentation du taux de croissance (**Park *et al.* 2001**). Dans cette étude, il apparaît cependant que la déviation du métabolisme vers la réduction du Fe (III) ne conduise pas à une augmentation de la densité cellulaire. Les rendements d'oxydation du glucose sont néanmoins supérieurs lorsque le Fe (III) est utilisé comme accepteur final d'électrons (79-84% de dégradation du glucose dans les cultures supplémentées en OHF, 45-56% dans les cultures en croissance sur glucose seul). Le couplage de l'oxydation du glucose à la réduction du Fe (III) conduit à la production de H₂ et CO₂ comme seuls métabolites fermentaires détectables par la souche BS2. En l'absence de Fe (III), le bilan fermentaire est complexe (fermentation de type mixte) et les composés détectés incluent l'acétate, le formate, le butyrate, le lactate, H₂ et CO₂. L'oxydation complète du glucose en CO₂ en présence de Fe (III) est en accord avec les études calorimétriques. **Lovley (1987)** a en effet suggéré que les organismes oxydant complètement le glucose en CO₂ en utilisant le Fe(III) comme accepteur final d'électrons présentent un avantage énergétique par rapport à ceux fermentant le glucose. La quantité d'énergie produite *via* le métabolisme du glucose couplé à la réduction du Fe(III) par la souche BS2, est ainsi supérieure à celle fournie par l'oxydation du glucose seul. Si l'ensemble des résultats obtenus sont concordants, il sera néanmoins nécessaire de reproduire l'analyse du bilan fermentaire sur une cinétique avant de conclure définitivement sur la voie métabolique empruntée. Un des paramètres importants est en effet de déterminer si la souche BS2 couple directement l'oxydation du glucose à la réduction du Fe (III) ou si des composés fermentaires intermédiaires sont utilisés par cette souche pour réduire le Fe (III). La confirmation d'une oxydation complète du glucose en présence d'OHF doit également être réalisée, et, si cette observation préliminaire est reproductible, ce résultat mettra en évidence que contrairement à ce qui était suggéré dans des études antérieures (**Lovley 1987, Lovley et Phillips 1988, Lovley 2003**), la majorité des équivalents réduits peuvent être transférés au Fe(III) par des souches fermentatives.

L'optimisation de l'utilisation du substrat dans le temps par la souche BS2 en présence de OHF est une observation particulièrement intéressante. Dans l'environnement oligotrophe que constitue la zone anoxique du Lac Pavin, la capacité de réguler l'utilisation du substrat en présence de Fe(III) peut conférer à cette souche un avantage écologique significatif. En effet, le Fe (III) représente, dans ce système, l'oxydant majoritaire et est donc potentiellement disponible pour ces bactéries. Coupler la réduction de cet élément à l'oxydation de composés organiques comme le glucose, peut permettre aux microorganismes empruntant cette voie métabolique

(comme la souche fermentative BS2) une meilleure utilisation du substrat (quantité d'énergie, rendement d'oxydation) sans toutefois conduire à une augmentation de la biomasse cellulaire.

La disponibilité du Fe (III) est un facteur important contrôlant la dégradation de la MO lorsque cet élément est utilisé comme accepteur final d'électrons. Si certaines formes de Fe (III) sont solubles [Fe^{3+} , complexes Fe(III), Fe(III) chélaté à la matière organique dissoute], la majorité du Fe(III) rencontré dans les environnements naturels est sous forme solide (**Morgan et Stumm 1964, Lindsay 1979**). Cette faible solubilité du Fe(III), implique souvent que les organismes établissent un contact direct avec les oxydes ferriques pour les réduire. Si les observations en MEB suggèrent que les cellules BS2 établissent un contact étroit avec les oxyhydroxydes ferriques, des études plus poussées doivent être réalisées pour déterminer si ce contact est nécessaire ou si des substances (navettes, chélateurs) peuvent être émises par la souche BS2 pour réduire le Fe(III). La réduction du Fe(III) par la souche BS2 apparaît d'autre part stimulée en présence de substances humiques ou de leur analogue (AQDS). Des études antérieures ont révélé que les substances humiques pouvaient effectivement stimuler la réduction du Fe(III) en jouant le rôle d'accepteur intermédiaire d'électrons entre le microorganisme et l'oxyde de Fe(III) (**Scott et al. 1998, Lovley et Blunt-Harris 1999**). **Benz et al. 1998** ont mis en évidence la capacité de souches fermentatives à réduire les substances humiques, et, des expériences complémentaires conduites sur la souche BS2 (résultats non présentés) ont révélé que cette dernière réduit l'AQDS en AQHDS. La présence de substances humiques peut ainsi être un facteur déterminant contrôlant les taux de réduction dissimilatrice du Fe(III) et présenter un impact notable dans la biogéochimie de cet élément dans la zone anoxique du Lac Pavin, comme nous l'avons préalablement suggéré (Article IV).

CONCLUSION

Si la plupart des bactéries ferro-réductrices connues et étudiées sont affiliées aux *Proteobacteria* (**Lovley 1993, Lovley et al. 1989, 1993, Caccavo et al. 1996, Hyun et al. 1999, Tebo et Obraztsova 1998**), plusieurs études ont révélé le potentiel ferro-réducteur de bactéries fermentatives du genre *Clostridium* (**Dobbin et al. 1999, Park et al. 2001**) dont *Clostridium saccharobutylicum* (**Hammann et Ottow 1974**). La signification écologique des bactéries fermentatives dans le cycle biogéochimique du Fe(III) pourrait être particulièrement notable dans la zone anoxique du Lac Pavin (autre exemple : souche DF32 affiliée à *C. metallovorans* isolée de la zone anoxique du Lac Pavin, Article 4). Afin de poursuivre les investigations sur ce processus, la

souche BS2 représente un bon modèle d'étude de l'activité de réduction dissimilatrice du Fe (III) par des bactéries Gram-positives de la colonne d'eau anoxique du lac Pavin. La souche BS2, affiliée à *Clostridium saccharobutylicum*, présente des caractéristiques morphologiques similaires à cette espèce et précédemment décrite par **Keis et al. (2001)**, néanmoins, l'émission d'une fluorescence sous excitation n'a, à notre connaissance, jamais été observée chez *C. saccharobutylicum* ou chez d'autres espèces de *Clostridia* et confère à la souche BS2 une forte originalité.

Ce travail a d'autre part mis en évidence la potentielle application des analyses thermodynamiques en microcalorimétrie aux études microbiologiques *in vitro*. Si un certain nombre de mesures nécessitent d'être répétées afin de définir un protocole standardisé et d'améliorer la reproductibilité des analyses, il peut être envisagé d'utiliser cette méthodologie pour déterminer les voies énergétiques les plus favorables lors de processus métaboliques complexes impliquant des consortia ou des assemblages microbiens (ex : associations syntrophes ou compétitives) et d'étendre ces analyses à des enrichissements réalisés à partir d'échantillons prélevés *in situ*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe.** 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**:260-296.
2. **Benz, M., B. Schink, and A. Brune.** 1998. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4507-4512.
3. **Caccavo Jr., F., J. D. Coates, R. A. Rossello-Mora, W. Ludwig, K. H. Schleifer, D. R. Lovley, and M. J. McInerney.** 1996. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **165**:370-376.
4. **De Castro, A. F., and H. L. Ehrlich.** 1970. Reduction of iron oxide minerals by a marine *Bacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **36**:317-327.
5. **Dobbin, P. S., J. P. Carter, C. G-S. San Juan, M. von Hobe, A. K. Powell, and D. J. Richardson.** 1999. Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**:131-138.
6. **Hammann, R., and J. C. G. Ottow.** 1974. Reductive dissolution of Fe₂O₃ by saccharolytic *Clostridia* and *Bacillus polymyxa* under anaerobic conditions. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **137**:108-115.
7. **Hungate, R.E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In Norris J. R., J. C. Ryden, and E. W. Ribbons (eds.) *Methods in Microbiology* 3B, pp. 117-132. Academic Press, New York.
8. **Huyn, M. S., B.-H. Kim, I. S. Chang, H. S. Park, H.-J. Kim, G. T. Kim, M. A. Kim, and D. H. Park.** 1999. Isolation and identification of an anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1. *J. Microbiol.* **37**:206-212.
9. **Keis, S., R. Shaheen, and D. T. Jones.** 2001. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:2095-2103.
10. **Lindsay, W. L.** 1979. *Chemical equilibria in soils*. John Wiley, New York.
11. **Lovley, D. R.** 1987. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review. *Geomicrobiol. J.* **5**:375-399.
12. **Lovley, D. R.** 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* **55**:375-399.

13. **Lovley, D. R.** 1992. Microbial oxidation of organic matter coupled to the reduction of Fe(III) and Mn(IV) oxides. In *Bio-mineralisation Processes*, pp. 101-114. Skinner, H. C. W. and R. W. Fitzpatrick (Eds.).
14. **Lovley, D. R.** 1993. Dissimilatory metal reduction. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**:263-290.
15. **Lovley, D. R.** 1995. Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Adv. Agron.* **54**:175-231.
16. **Lovley, D. R., and Blunt-Harris E.** 1999. Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4252-4254.
17. **Lovley, D. R.** 2003. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reducing prokaryotes. Accessible via le site "The Prokaryotes": <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/419/COMPLETE.htm>.
18. **Lovley, D. R., J. D. Coates, E. L. Blunt-Harris, E. J. P. Philipps, and J. C. Woodward.** 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**:445-448.
19. **Lovley, D. R., J. L. Fraga, E. L. Blunt-Harris, L. A. Hayes, E. J. P. Phillips, and J. D. Coates.** 1998. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **26**:152-157.
20. **Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips.** 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1472-1480.
21. **Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips.** 1989. Requirement for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe (III)-reducing sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3234-3236.
22. **Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, and D. J. Lonergan.** 1989. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:700-706.
23. **Lovley, D. R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby, and S. Goodwin.** 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.* **159**:336-344.
24. **Mallet, C., and D. Debroas.** 2000. Regulation of aminopeptidase activity in the sediment of a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **149**:327-335.
25. **Morgan, J. J., and W. Stumm.** 1964. The role of multivalent metal oxides in limnological transformations as exemplified by iron and manganese, pp. 103-118. In *Proceedings of the Second conference on Water Pollution Research*. Pergamon, Elmsford.
26. **Munch, J. C., and J. C. G. Ottow.** 1983. Reductive transformation mechanisms of ferric oxides in hydromorphic soils. *Ecol. Bull.* **35**:383-394.
27. **Park, H. S., B. H. Kim, H. S. Kim, H. J. Kim, G. T. Kim, M. Kim, I. S. Chang, Y. K. Park, and H. I. Chang.** 2001. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe* **7**:297-306.
28. **Scott, D. T., D. M. McKnight, E. L. Blunt-Harris, S. E. Kolesar, and D.R. Lovley.** 1998. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2984-2989.
29. **Tebo, B. M., and A. Y. Obraztsova.** 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(IV), U(IV), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**:193-198.

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

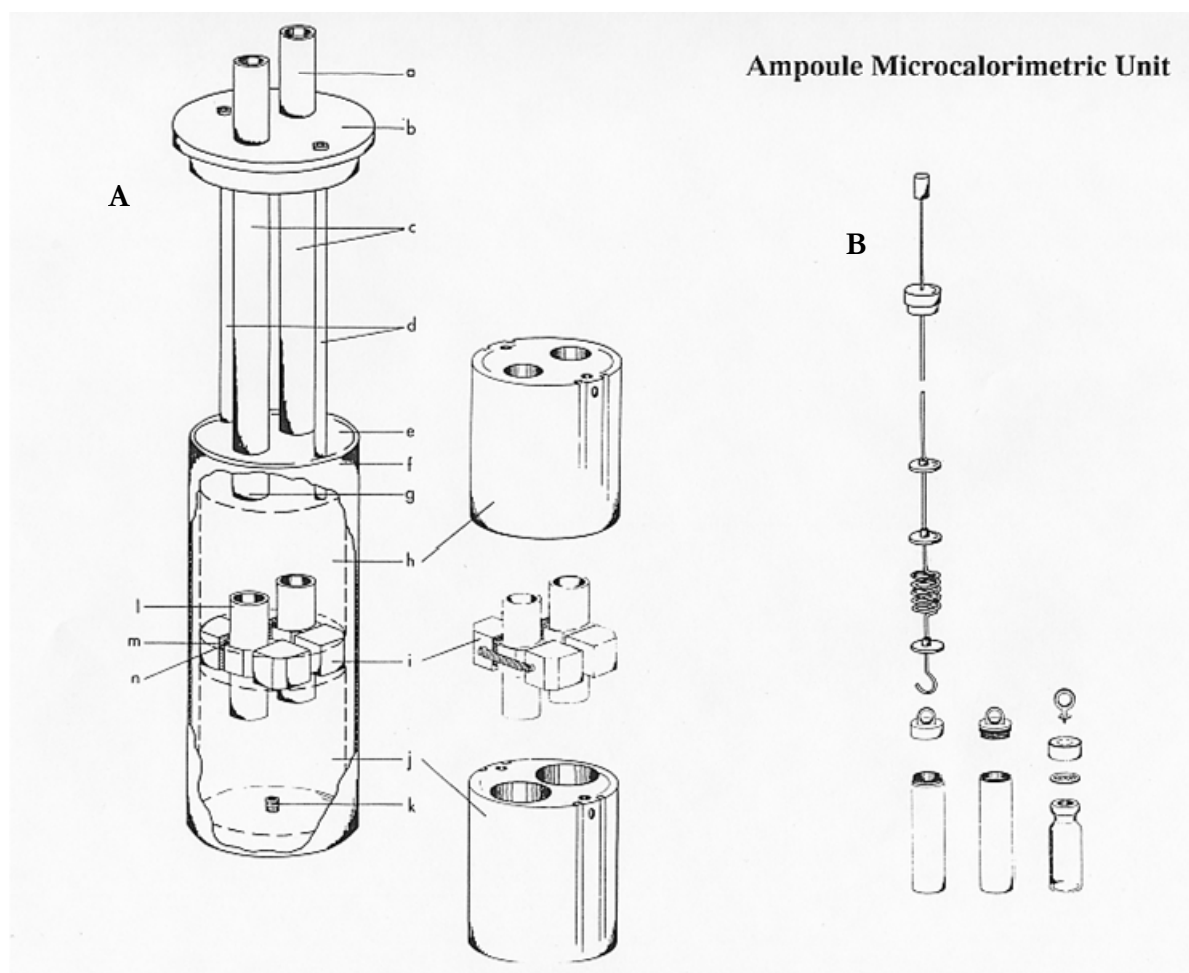
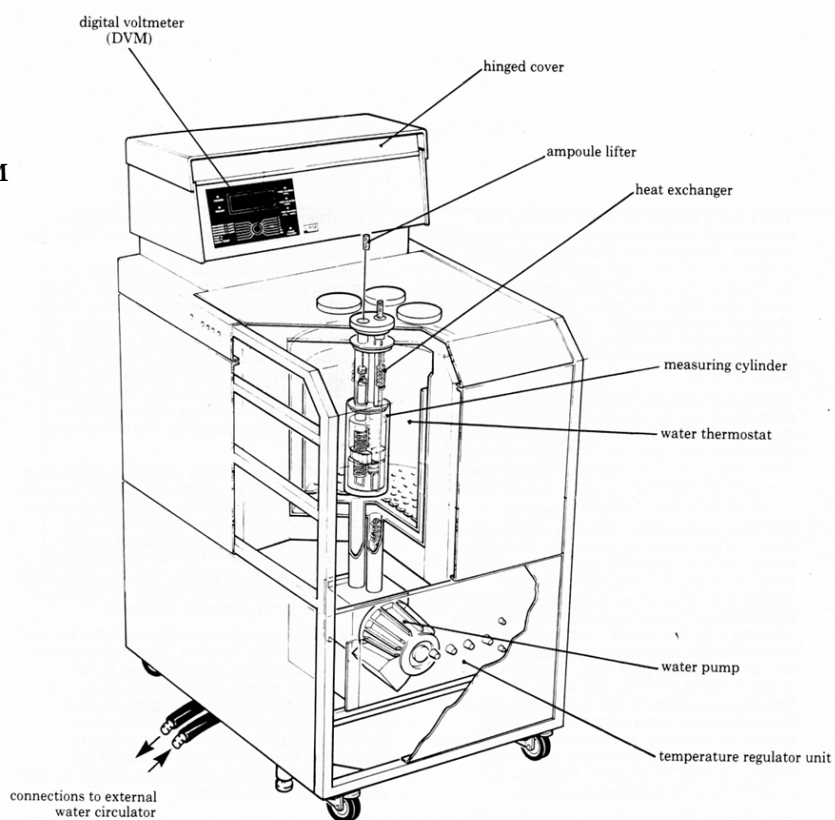


Figure S.1 : (A) cylindre de mesure du calorimètre, (B) Ampoule pour mesure microcalorimétrique.



Figure S.2: Calorimètre 2277 TAM
(Thermometric - LKB)



PRE-ARTICLE VI*

Etude préliminaire d'un biofilm acétogène : Un modèle pour étudier le processus de redondance fonctionnelle ?

INTRODUCTION

L'acétate, est un intermédiaire clé de la transformation de la matière organique dans l'environnement (**McInerney et Bryant 1981**). Au sein du réseau microbien anaérobie, ce dernier représente en effet un lien trophique essentiel, précurseur de nombreux processus métaboliques (sulfato-réduction, méthanogénèse, *etc.*). La contribution quantitative de l'acétate dans les flux de carbone est également non négligeable. Il est ainsi estimé que 10^{13} Kg d'acétate sont produits annuellement dans les environnements anoxiques (**Wood et Ljungdahl 1991**). Ce métabolite peut être généré, simultanément à d'autres produits fermentaires, *via* l'activité de nombreux microorganismes hétérotrophes. Cependant la qualification d'"acétogène" est restrictive des microorganismes catalysant la synthèse réductive du CO₂ en acétate *via* la voie de l'Acéthyl-CoA ou voie de "Wood-Ljungdahl" (**Drake 1994, Ljungdahl 1986**). Bien que cette voie métabolique "unifie" les acétogènes, ces dernières constituent probablement le groupe présentant la plus forte versatilité physiologique (**Drake et al. 1997, 2002**). Ces bactéries ubiquistes peuvent en effet croître en autotrophie sur H₂-CO₂ et/ou en hétérotrophie sur de nombreux composés organiques. Des activités mixotrophes (H₂ et substrat organique) ont également été observées chez certaines espèces (**Breznak et Kane 1990, Wood et Ljungdahl 1991**).

En dépit de l'importance écologique des acétogènes dans les flux de carbone et d'énergie (10% de l'acétate dans les écosystèmes anoxiques est issu de l'acétogénèse réductive, **Wood et Ljungdahl 1991**), peu d'études ont été conduites sur ce groupe fonctionnel (**Lovell et Leaphart 2005**). Ceci résulte essentiellement des difficultés inhérentes à leur détection, à leur identification, à la caractérisation de leur diversité et de leur distribution (**Lovell et Leaphart 2005**). En effet, les acétogènes, bien qu'inféodées au domaine des *Eubacteria* (**Drake et al. 2006**), sont phylogénétiquement très diversifiées (**Tanner et Woese 1994**) et fréquemment affiliées à des espèces non acétogènes (**Drake et al. 2002**). Actuellement une centaine d'espèces ont été isolées se répartissent dans vingt genres différents (**Drake et al. 2002**). La plupart (17 genres) sont affiliés au phylum des Firmicutes (Gram-Positive à faible G+C %) (**Collins et al. 1994, Zhilina et al.**

* Prépublication dans une forme non définitive nécessitant des compléments d'études

1998, Staeckebrandt *et al.* 1999), au sein duquel elles sont rencontrées dans 8 des 19 clusters de *Clostridium* (Collins *et al.* 1994).

Les acétogènes apparaissent largement distribuées dans les environnements anoxiques permanents (sédiments marins ou lacustres, écosystèmes digestifs, *etc.*, Drake *et al.* 2006), et le processus d'acétogénèse doit sans nul doute revêtir une importance écologique notable dans le monimolimnion du Lac Pavin. Les études précédemment conduites (Article 1 et Article 3) sur cette zone particulière ont révélé que les communautés d'*Archaea* méthanogènes étaient dominées par les *Methanosarcinales* et que les séquences d'ARNr16S archéennes étaient majoritairement affiliées à *Methanosaeta*, méthanogènes acétoclastes obligatoires. L'acétate pourrait ainsi constituer un des principaux précurseurs métaboliques du processus de méthanogénèse dans la zone anoxique permanente de cet écosystème. L'acétogénèse a été étudiée *in vitro*, dans le cadre d'un travail encore préliminaire, à partir de trois souches microbiennes isolées de la zone anoxique du Lac Pavin et se développant dans une structure très particulière assimilable à un biofilm qui s'est formé et a persisté dans l'un de nos milieux d'enrichissement incubé sous une atmosphère de H₂/CO₂.

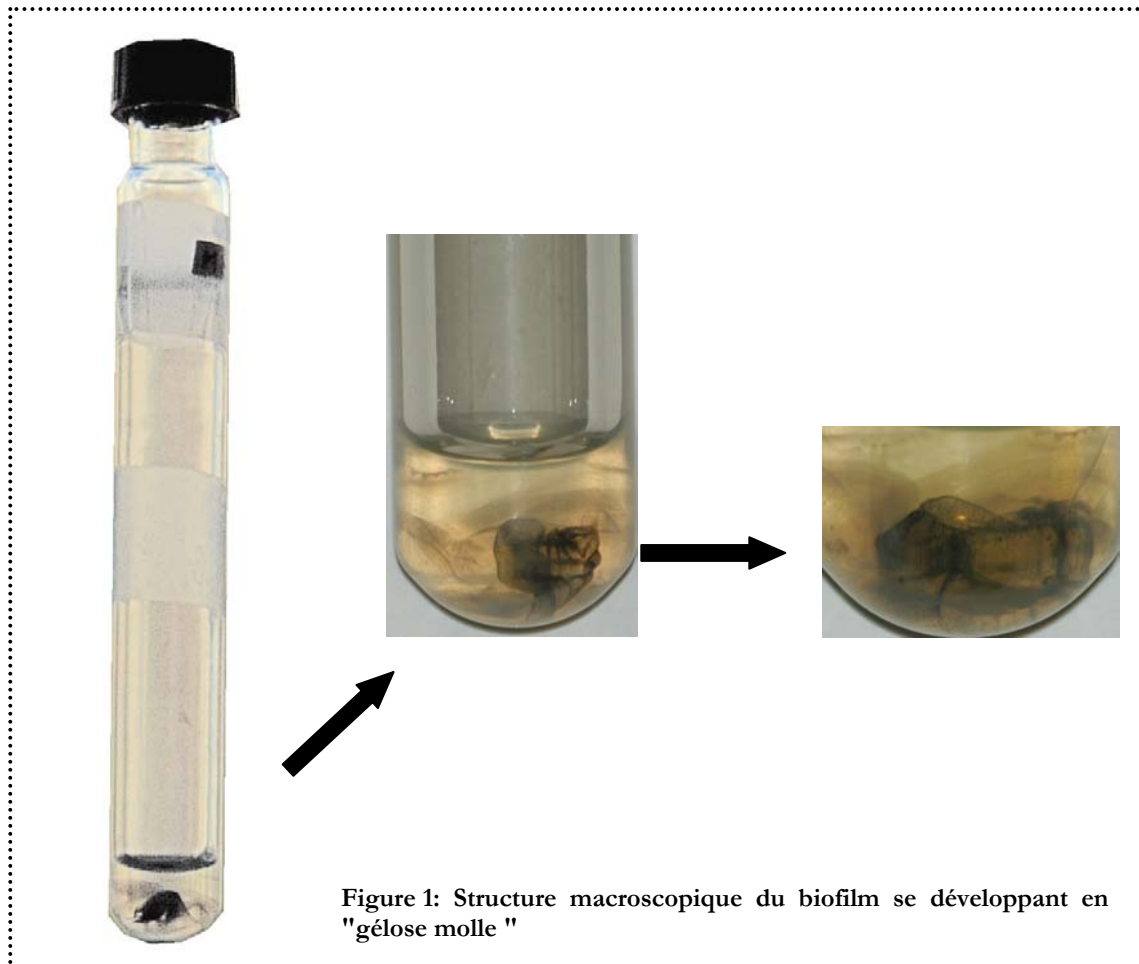
MATERIEL ET METHODES

Source des organismes : Les échantillons ont été prélevés en août 2003 dans la couche sédimentaire 0-3 cm du Lac Pavin en utilisant un carottier[†] multiple de type Jenkin-Mortimer, selon le protocole décrit par Mallet et Debros (2000). Le carottage a été réalisé à la verticale de l'isobathe 92 m correspondant à la profondeur maximale du lac.

Culture et isolement du biofilm (Figure 2) : Les méthodes de culture anaérobie classiques ont été utilisées sur l'ensemble de cette étude (Hungate 1969, Bryant 1972). Les milieux de culture ont été portés à ébullition, refroidis à 60°C sous atmosphère CO₂ et répartis en tubes de Hungate sous la même phase gazeuse, à raison de 9 ml par tube.

Le sédiment (V=9.25 cm³, P=3 g) a été dilué dans 10 ml de solution minérale de Bryant et Burkey [K₂HPO₄ (400 mg), KH₂PO₄ (400 mg), (NH₄)₂SO₄ (0.8 g), NaCl (0.8g), MgSO₄, 7H₂O (80 mg), CaCl₂, 2H₂O (80 mg), eau distillée *qsp* 1 litre]. 1 ml de la dilution a été injecté à travers le septum butyle, en conditions stériles, dans le tube contenant le milieu de culture (préalablement stérilisé par autoclavage, 121°C, 20 min) dont la composition est la suivante : K₂HPO₄ (300 mg), KH₂PO₄ (300 mg), (NH₄)₂SO₄ (0.6 g), NaCl (0.6g), MgSO₄, 7H₂O (60 mg), CaCl₂, 2H₂O (60 mg), extrait de

[†] Carottier : voir Annexe 9



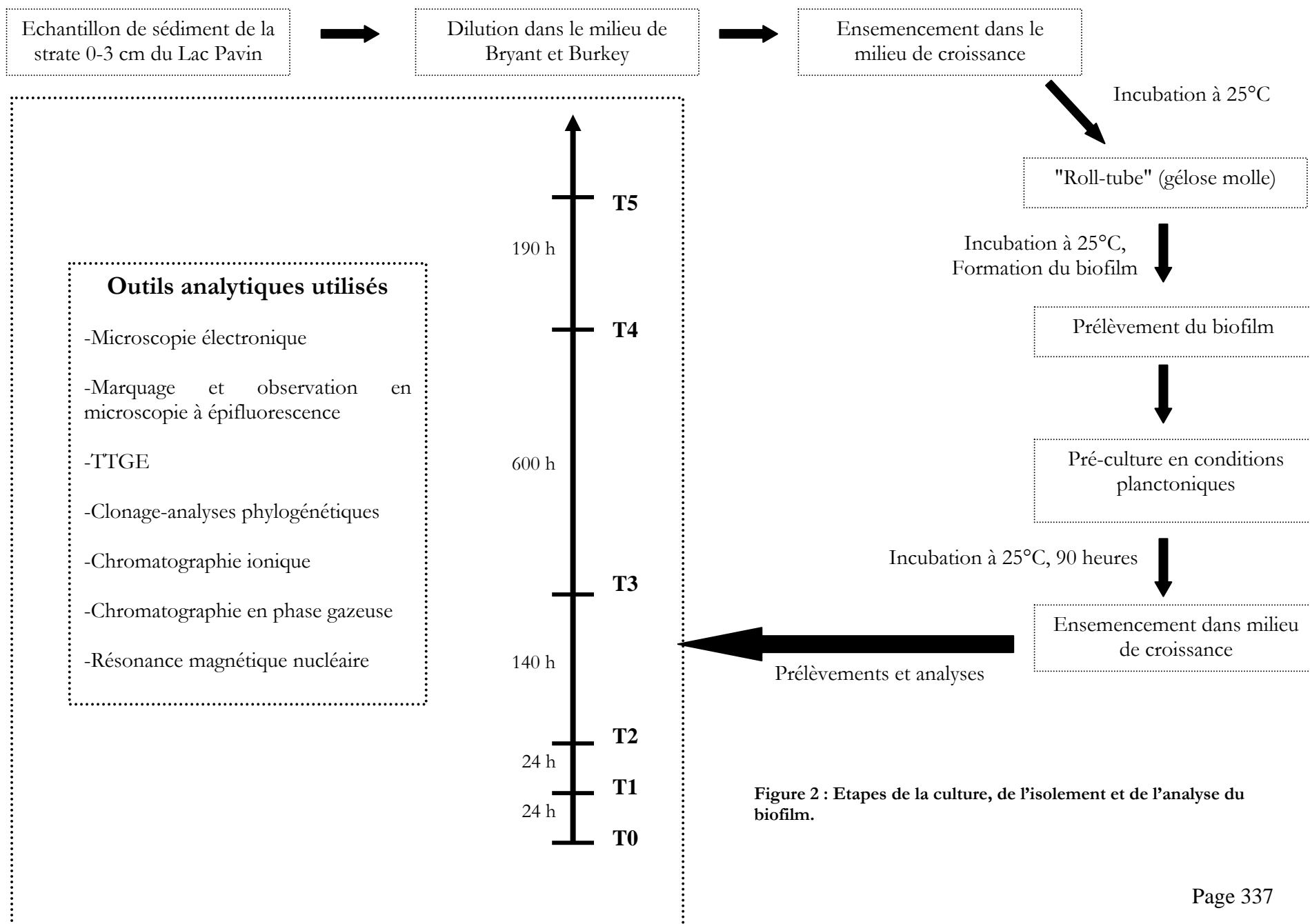


Figure 2 : Etapes de la culture, de l'isolement et de l'analyse du biofilm.

final de 50 µl. Les amplifications ont été réalisées sur un thermocycleur PTC-200 (MJ research) en utilisant les programmes suivants : 5 min à 95°C, suivi par 30 cycles composés chacun de trois étapes : dénaturation (1 min à 95°C pour le clonage; 30 s à 94°C pour la TTGE), hybridation (1 min à 55 °C pour le clonage; 30s pour la TTGE), et extension (1 min à 72°C pour le clonage; 30 s pour laTTGE) et une extension finale (10 min à 72°C pour le clonage; 7 min pour la TTGE). L'intégrité et la taille des amplicons ont été vérifiés sur un gel d'agarose 1.0% dans du tampon TBE 1X. Les produits d'amplification ont été dosés en utilisant le Kit "DNA quantitation kit, Fluorescence Assay" (Sigma).

Procédure TTGE: 200 ng de produits PCR ont été déposés sur gel de polyacrylamide 8%. L'électrophorèse a été réalisée avec l'appareillage "D-code Universal mutation detection system" (Biorad), dans les conditions suivantes : 68V, incrément de 0,2°C par heure (66°C-69,7°C) pendant 17 heures dans du tampon TAE 1,25 X. A l'issu de l'électrophorèse, le gel a été rincé 20 minutes dans du TAE 1,25X et incubé 60 minutes en présence de Gelstar Nucleic acid (0,5 X, Tebu Bio). La photographie du gel a été réalisée sous UV avec l'Analyser Versadoc (Imaging system, Biorad) et les profils TTGE obtenus ont été analysés avec le logiciel "Quantity one" (Biorad).

Construction des librairies de clones: Les produits PCR issus des prélèvements à T3 et à T5 ont été ligués en utilisant le kit de clonage TOPO TA et transformés dans des cellules *Escherichia coli* TOP10F' compétentes selon les instructions du fournisseur (Invitrogen corporation, San Diego, CA, USA). Les clones recombinants ont été détectés par sélection blanc/bleu des colonies sur milieu Luria-Bertani (LB) gélosé contenant 100 µg.ml⁻¹ d'ampicilline et 80 µg.ml⁻¹ de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) et incubés 12 heures à 37°C. Les librairies de clones ont été construites par repiquage de colonies blanches choisies aléatoirement. Pour chaque échantillon, 48 colonies ont été sélectionnées et la présence de l'insert dans le plasmide a été contrôlée par une amplification directe avec les amorces M13-f et M13-r en utilisant le programme décrit précédemment (à l'exception du préchauffage : 10 min à 95°C). Les produits d'amplification ont été contrôlés par électrophorèse (1.0% dans du tampon TBE)

Les fragments d'ADNr16S issus de l'amplification M13 ont été digérés par l'enzyme de restriction HaeIII (Qbiogene) à 37°C pendant 12 h. A l'issu de l'électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve 3:1 (2.5% (wt/vol), Tebu-Bio) contenant du bromure d'éthidium (0.5 mg.l⁻¹), les profils de restriction ont été analysés. L'ADN plasmidique d'un représentant de chaque groupe a été isolé en utilisant le kit de purification plasmidique "QIAprep" (Qiagen, Chatsworth, Calif.). 19 clones ont été sélectionnés et le séquençage a été réalisé par la société MWG Biotech (Roissy CDG, France) en utilisant les amorces 27f et 1492r. Les séquences ont été comparées avec les banques de données EMBL et Genbank en utilisant le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, **Altschul et al. 1990**) pour déterminer leurs affiliations phylogénétiques approximatives. Un positionnement

plus précis a été réalisé avec le logiciel ARB et sa banque de données associée (**Ludwig *et al.* 2004**), après alignement et corrections manuelles en prenant en considération la structure secondaire de l'ADNr16S. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de "Neighbor-Joining". Les clones ont été secondairement amplifiés avec les amorces 27f-GC et 518r et déposés sur le même gel de polyacrylamide que les échantillons issus de l'amplification directe à partir de l'ADNg extrait du biofilm.

Observations microscopiques

Coloration des cellules au DAPI : Un aliquot de la culture a été fixé avec 10% (vol/vol) de formaldéhyde 37% et filtrés sous vide ($p = 100$ mbar) sur membranes noires en polycarbonate, de porosité $0.2 \mu\text{m}$ (type GTBP, 25 mm diamètre, Millipore). Les filtres ont été incubés 20 minutes dans du DAPI ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) à l'obscurité, puis rincés avec 30 ml d'eau distillée (ED) stérile. Les filtres, séchés à l'obscurité sur papier Whatman, ont été placés entre lames et lamelles dans de l'huile à immersion Olympus ($nd = 1,516$; 23°C , sans fluorescence). Les observations ont été réalisées en microscopie à épifluorescence ($\times 1000$) sous filtres UV (modèle DMIRB, Leica).

Préparation et observation des échantillons en microscopie électronique à balayage (MEB) : les procédures suivent la méthode P. Lejeune précédemment décrite (Pré-Article V)

Procédures analytiques

Chromatographie ionique (Figure 9) : La détermination de la composition en cations a été réalisée sur Chromatographie DIONEX ICS 1500 et la détermination de la composition en anions sur chromatographie DIONEX 320. Les analyses et l'intégration ont été effectuées avec le logiciel Chromeleon.

Résonance Magnétique nucléaire : Les composés issus de la fermentation (AGCC**) ont été analysés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton sur un appareillage RMN 400 MHz, permettant sur un seul spectre de visualiser l'ensemble des AGCC. L'étalon interne est le TSPD4 (10 mM) et le temps de relaxation est de 190 secondes (16 Scan). La quantification a été réalisée avec le logiciel Xwinnmr 2.6.

Chromatographie phase gazeuse : Les concentrations en H_2 ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse, sur un chromatographe DI700 (Delsi Instrument). L'injecteur et la colonne de séparation (colonne Supelco Carboxen 1000) sont chauffés à 100°C . Le gaz vecteur est l'argon et la détection est réalisée par catharométrie.

** AGCC : Acides gras à courtes chaînes

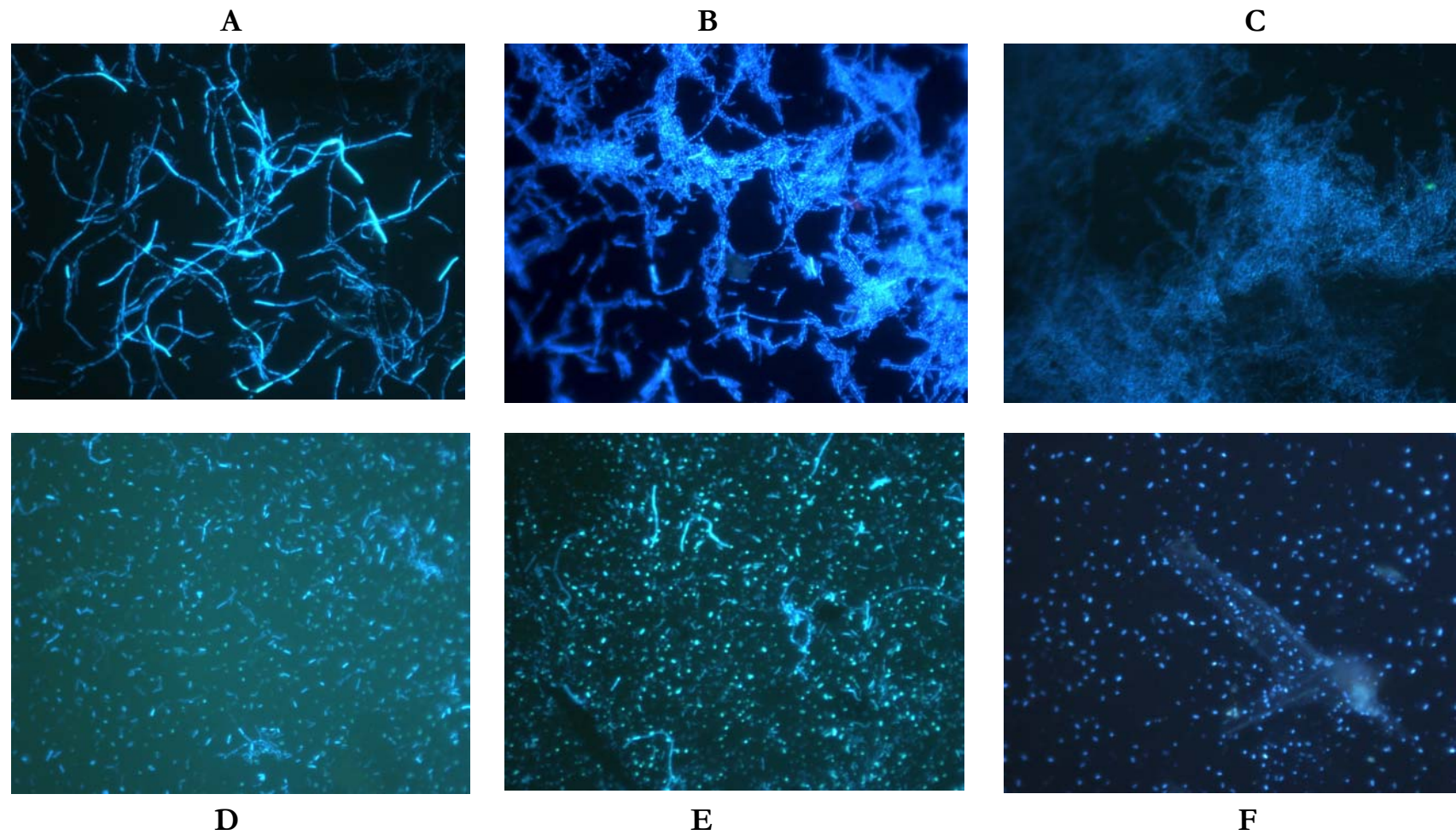


Figure 3 : Evolution de la structure du biofilm. Image réalisée en microscopie en épifluorescence après coloration au DAPI. (A) image à T0, (B) image à T1, (C) image à T2, (D) image à T3, (E) image à T4, (F) image à T5

A

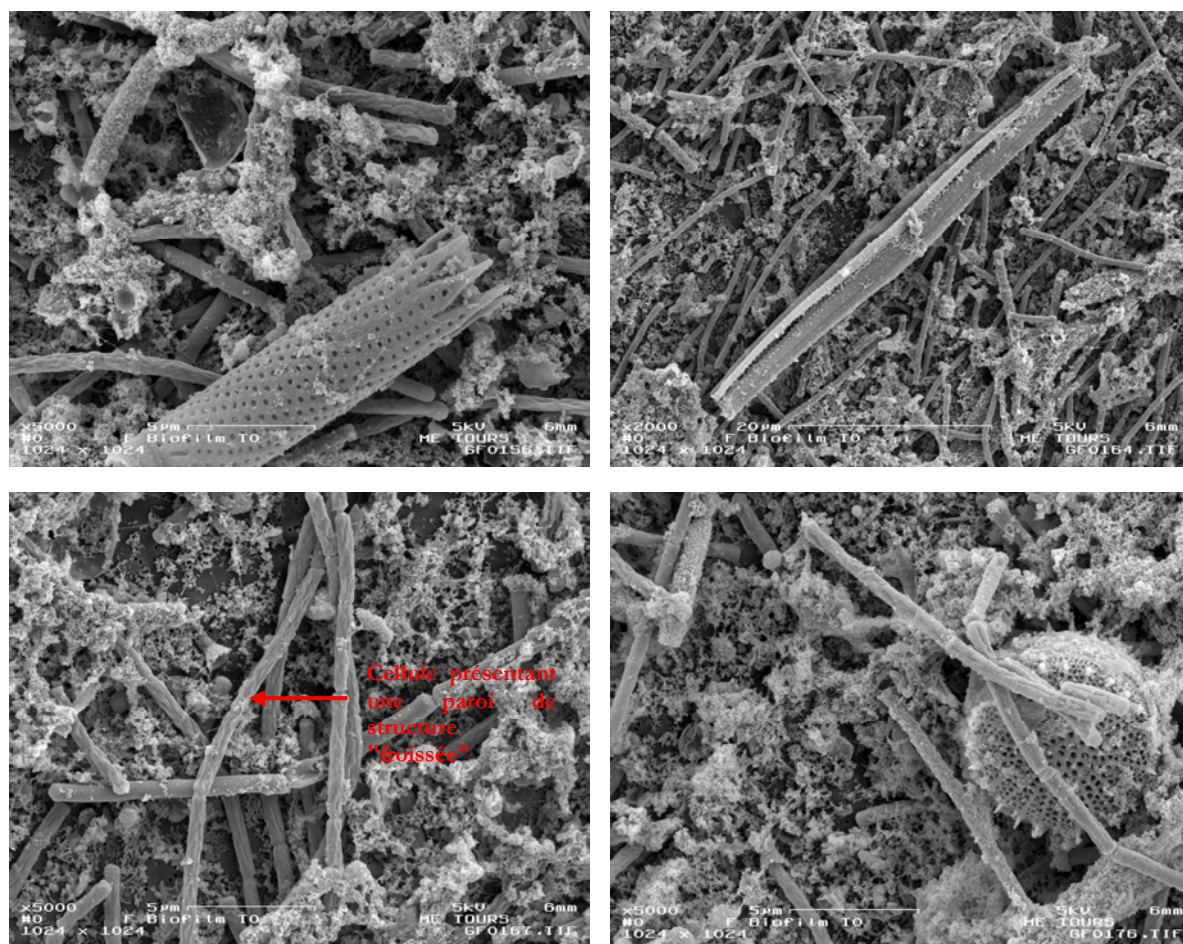
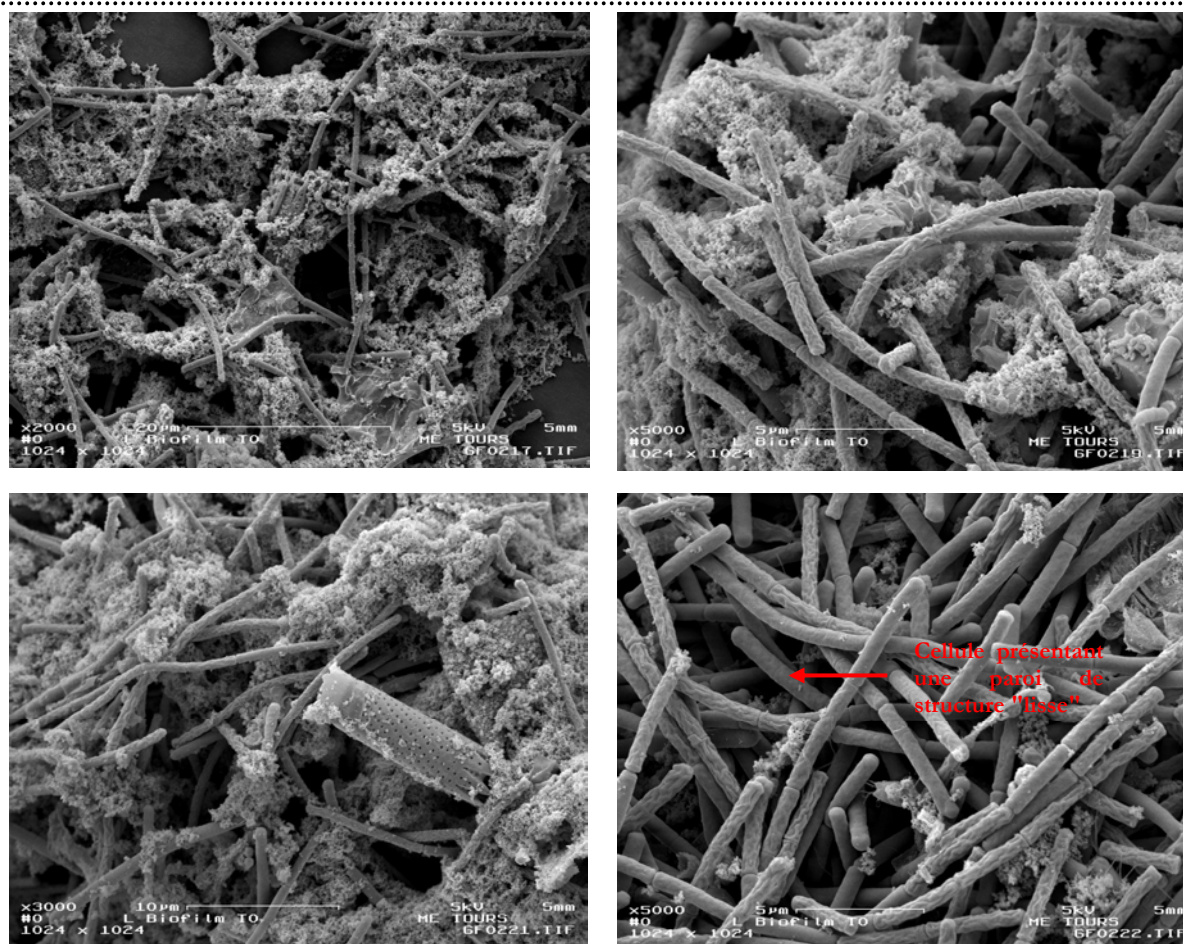


Figure 4 : Photos en Microscopie électronique à balayage du biofilm acétogène après 24 heures
(A : Observations à partir de cultures sur filtres, B : Observations à partir de cultures en suspension)

B



A

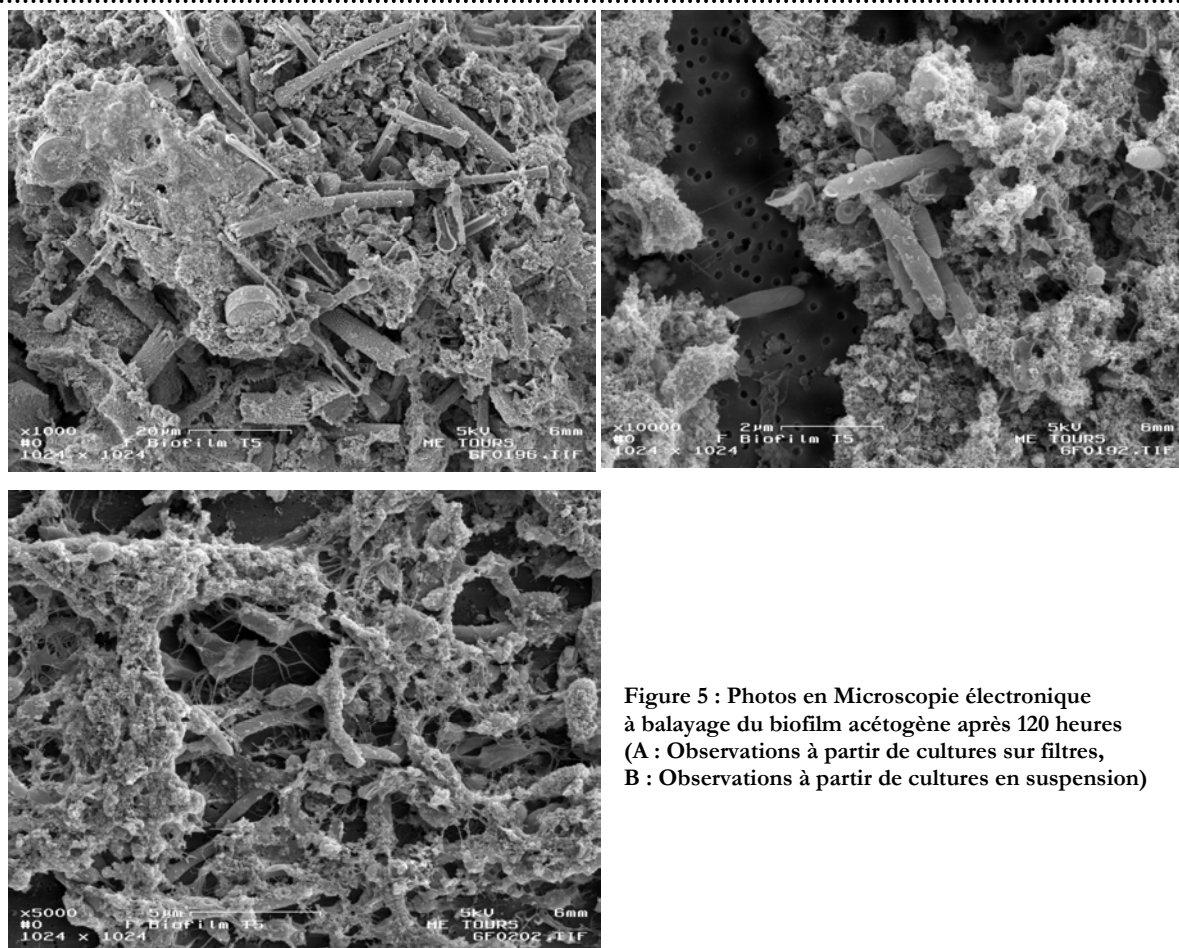
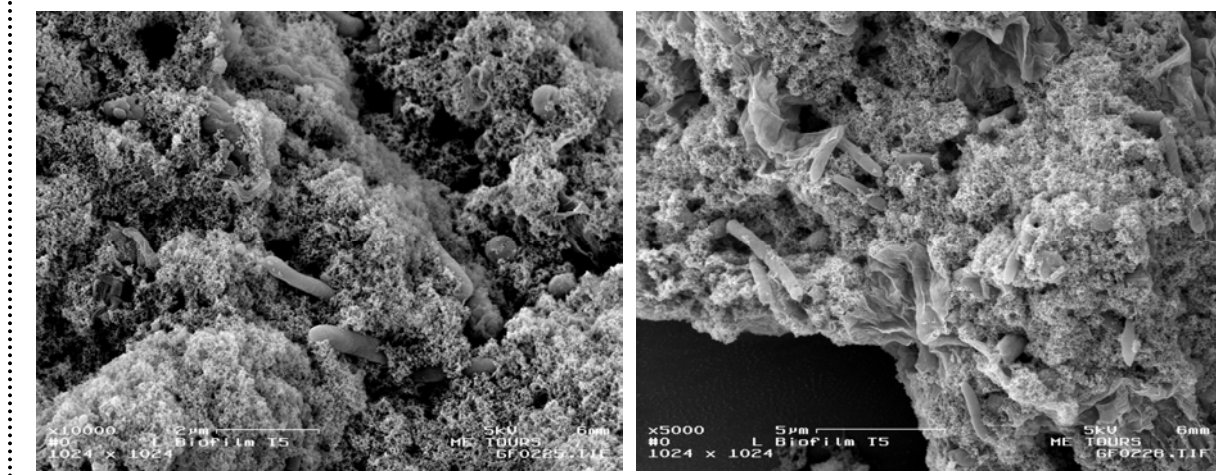


Figure 5 : Photos en Microscopie électronique à balayage du biofilm acétogène après 120 heures
(A : Observations à partir de cultures sur filtres,
B : Observations à partir de cultures en suspension)

B



RESULTATS

Evolution de la structure du biofilm: De T0 à T2, les cellules bactériennes s'associent en une structure de plus en plus enchevêtrée ([Figure 3](#)). Les cellules sont en forme de bâtonnets, dont la taille minimale est comprise entre 3 et 6 μm et s'associent le plus fréquemment "en chaîne" ([Figure 3](#)). A partir de T3, les cellules se dissocient les unes des autres et adoptent une conformation sphérique ([Figure 3](#)). Les images en microscopie électronique à balayage ([Figure 4](#)) révèlent une association des bactéries au sein d'une matrice composée notamment de diatomées issues du jus de sédiment utilisé pour la préparation du milieu de culture. La paroi des cellules bactériennes exhibent deux structures distinctes : un aspect lisse et un pouvant être qualifié de "froissé" ([Figure 4](#)). Après 120 heures de culture, l'échantillon est très dispersé avec quelques concrétions et de rares cellules bactériennes ([Figure 5](#)).

Profils TTGE, clonage et analyse phylogénétique: Pour chaque date de prélèvement, trois bandes sont observables sur les profils TTGE, suggérant la coexistence de trois espèces au sein du biofilm microbien ([Figure 6](#)). Sur la base des intensités respectives de chaque bande, l'espèce représentée par la bande 1 apparaît dominante sur l'ensemble de l'étude (abondance relative entre 60% (T0) et 80% (T2), [Figure 7](#)). L'intensité de la bande 2 est plus prononcée à T4 et T5 (T0 : 9,5%, T5 : 30%), suggérant que l'abondance relative de l'espèce associée augmente. Parallèlement, l'abondance relative de l'espèce représentée par la bande 4 décroît entre T0 (30%) et T5 (0%) ([Figure 7](#)).

L'identification des espèces bactériennes associées au sein de ce biofilm a été réalisée par clonage et séquençage. Compte tenu du profil TTGE, seuls les échantillons prélevés à T3 et T5 ont été clonés. Pour chaque échantillon, 24 clones ont été digérés par l'enzyme de restriction HaeIII. Les différents profils de restriction obtenus ont été analysés (résultats non présentés) et regroupés selon leurs similarités en 3 OTUs⁶, ces résultats sont cohérents et confirment l'analyse TTGE suggérant la coexistence de trois espèces bactériennes au sein du biofilm. Deux représentants de chaque OTU ont été séquencés et l'affiliation phylogénétique des espèces représentées par les séquences ADN_r16S est présentée [Figure 8](#) et [Tableau 1](#). Afin d'établir la correspondance entre les espèces identifiées et le profil TTGE, les clones ont été amplifiés avec les amorces 27f-GC et 518r et déposés sur le même gel de polyacrylamide que les amplicons précédents ([Figure 6](#)). Chaque clone correspond à une des bandes suggérant ainsi que l'espèce représentée par le clone 1 (C1) affiliée à *C. glycolicum* est celle dominant le biofilm et que les espèces représentées par les clones C2 et C3 présentent respectivement un accroissement et une diminution de leurs abondances relatives.

⁶ OTU : Operationnal Taxonomic Unit

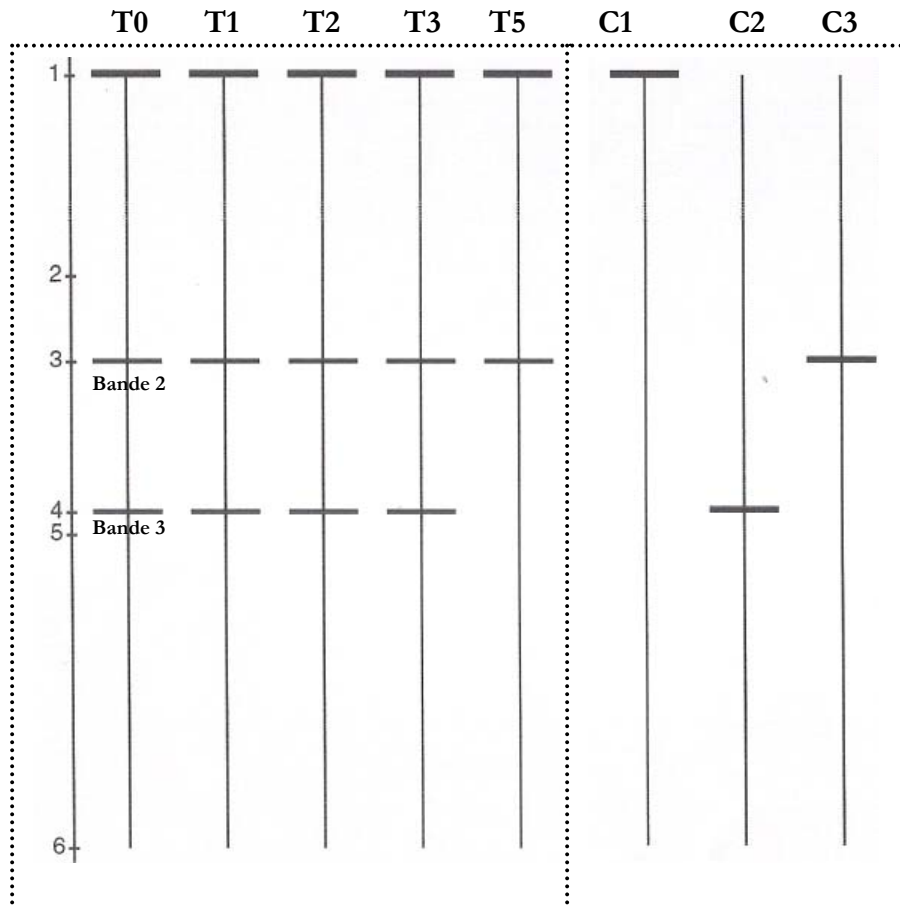


Figure 6 : Diagramme des profils TTGE. La partie gauche du diagramme (T0-T5) représente les profils obtenus à partir des amplicons issus de l'ADNg extrait de la culture aux différents temps de prélèvements. La partie droite (C1-C3) correspond au profil d'un représentant de chaque OTUs définis après analyse RFLP.

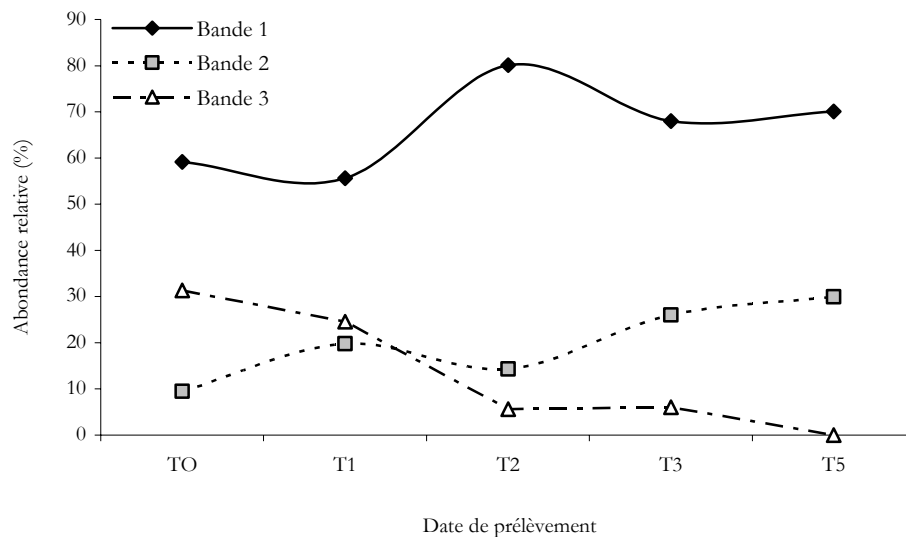


Figure 7: Evolution de l'abondance relative (en %) des trois bandes visualisées sur les profils TTGE entre T0 et T5.

Clone/ Séquence	Affiliation la plus proche		
	Identification	N° accession	% Similarité
C1	<i>Clostridium glycolicum</i> DSM 1288	X76750	99.9
C2	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i>	AY007244	99.9
C3	<i>Clostridium bifermentans</i>	Y18787	99

Tableau 1 : Affiliation des espèces représentées par les séquences ARNr16S des clones C1, C2 et C3 avec les espèces cultivées les plus proches.

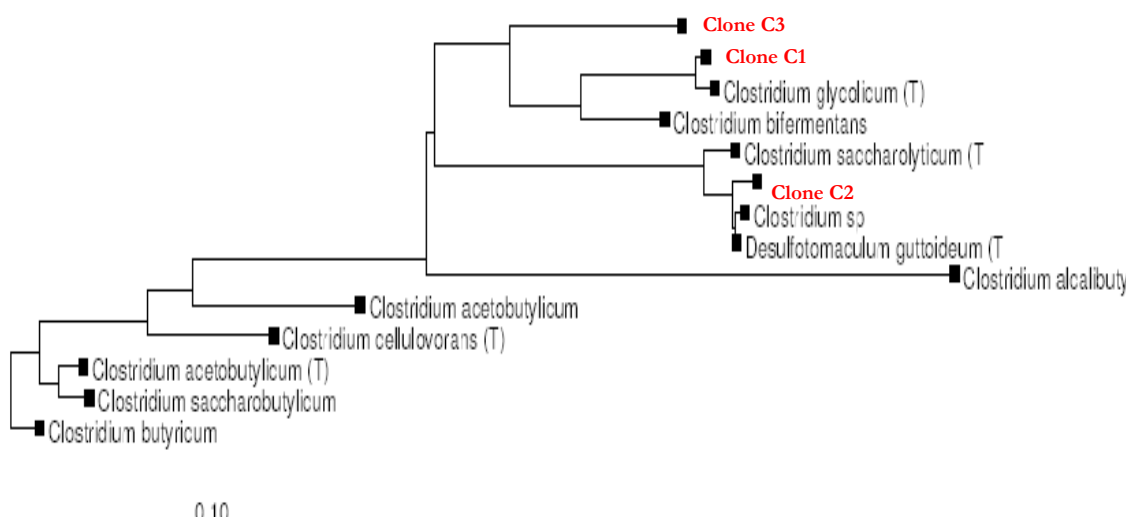


Figure 8 : Dendrogramme phylogénétique construit par la méthode de Neighbor-Joining illustrant les relations entre les clones C1, C2 et C3 et les espèces cultivées les plus proches.

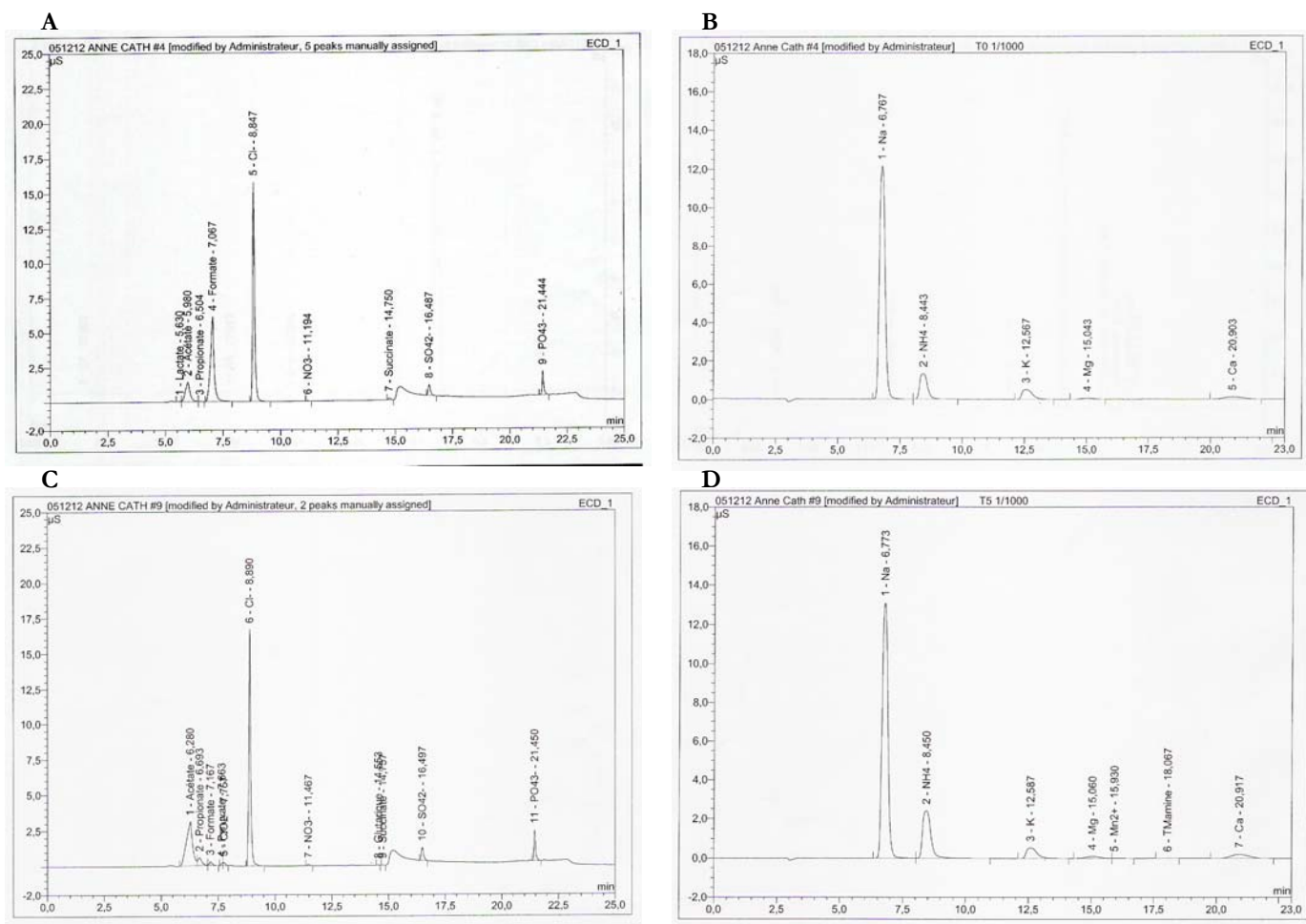


Figure 9: Exemples de chromatogrammes obtenus après analyse par chromatographie anionique à T0 (A) et T5 (C) et cationique (B) T0 et D (T5).

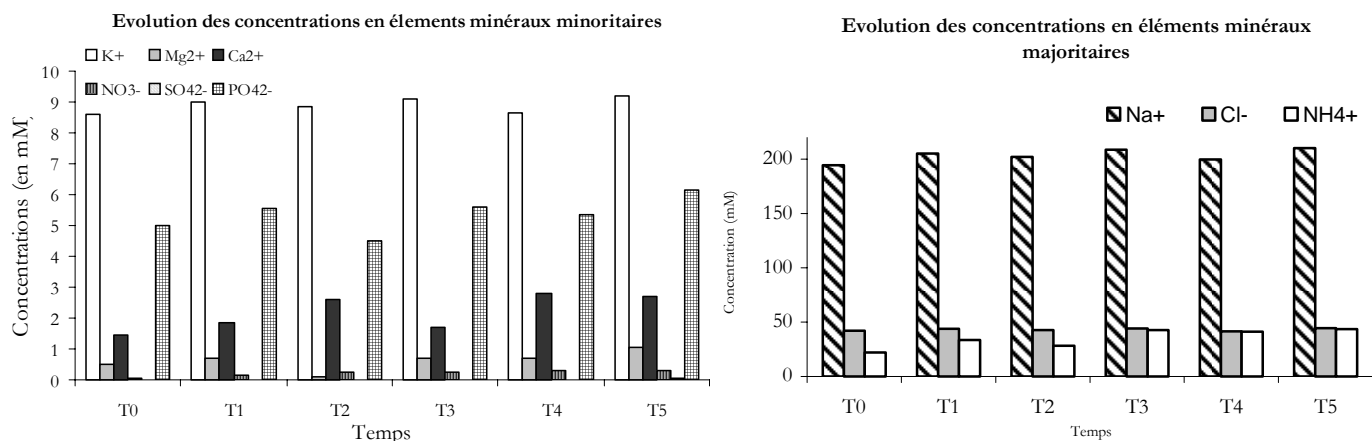


Figure 10 : Evolution des concentrations en éléments minéraux minoritaires (A) et majoritaires (B) dans les conditions de culture.

Etudes métaboliques : Les résultats obtenus par chromatographie ionique révèlent que la composition minérale du milieu de culture reflète les apports contrôlés (Figure 10). Les apports anioniques et cationiques du jus de sédiment apparaissent ainsi négligeables. Ce dernier ne constitue donc pas, *a priori*, une source potentielle de donneurs ou d'accepteurs d'électrons. D'autre part, que l'on s'adresse aux éléments minéraux majoritaires ou minoritaires, aucune évolution marquée de leurs concentrations n'est notable.

La chromatographie ionique permet également la détection de composés carbonés ionisables de moins de 5 atomes de carbone. La Figure 11 présente l'évolution des concentrations en acétate, formiate, propionate et pyruvate représentant les seuls composés fermentaires détectés par cette méthode. Les résultats obtenus mettent en évidence une consommation de formiate concomitante à une production d'acétate entre T0 et T3. Le formiate est indétectable à partir de T3, cependant la concentration en acétate continue d'augmenter (T3 : 47mM, T5 : 61mM). L'H₂ dont les concentrations restent stables entre T0 et T3 (T0 : 59mM, T3 : 63mM) est complètement consommé à partir de T3. La concentration en propionate augmente légèrement à partir de T3 (T0 : 0,2mM, T5 : 4,5mM). Le pyruvate est quasi-indétectable et sa concentration reste constante sur l'ensemble de l'étude (0.58 ± 0.08 mM).

Afin de confirmer les résultats obtenus par chromatographie ionique sur les acides gras et de vérifier si d'autres métabolites carbonés ne sont pas produits ou consommés, les échantillons ont été analysés en résonance magnétique nucléaire du proton.

	T0	T1	T4	T5
Formate	40.2	29.1	-	-
Acétate	20.1	16.5	36.5	41.3

Tableau : Concentrations en formate et acétate analysée par RMN (en mM)

Les seuls composé détectables par RMN sont le formate et l'acétate, l'évolution des concentrations suit celle observée par chromatographie ionique.

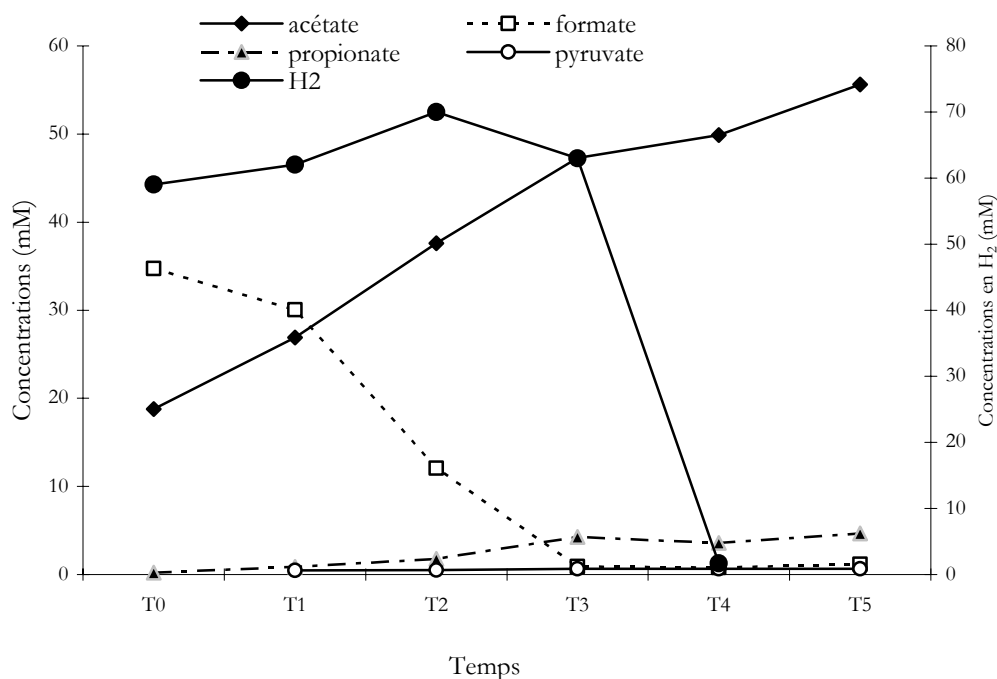


Figure 11 : Evolution des concentrations en acétate, propionate, formate, pyruvate et H₂ (en mM).

DISCUSSION

Cette étude, certes préliminaire, met néanmoins en évidence la production d'acétate au sein d'une association interspécifique impliquant trois espèces affiliées à *Clostridium glycolicum*, *Desulfomaculatum guttoideum* et *Clostridium bifermentans*. Ce métabolite est dans un premier temps formé *via* la réduction du formate et dans un second temps (à partir de T3) à partir de H₂/CO₂. L'utilisation de ces substrats suggère qu'une ou plusieurs acétogènes "vraies" sont impliquées dans la synthèse réductive de l'acétate et que la voie de l'acétyl-CoA est utilisée. En effet, cette dernière peut être schématiquement divisée en deux branches (Figure 12). La réduction initiale de CO₂ est catalysée soit par la formate déshydrogénase, soit par l'acétyl-CoA synthétase (Drake 1994, Ljungdahl 1994)

L'acétate est le seul produit fermentaire présentant des concentrations significatives à la fin de la période d'incubation, aussi deux hypothèses peuvent être formulées :

- H1 : Plusieurs espèces au sein de ce biofilm sont impliquées dans la production de ce métabolite
- H2 : Une seule espèce est impliquée et l'efficacité des échanges interspécifiques ne permet pas de détecter d'éventuels composés intermédiaires utilisés par les deux autres.

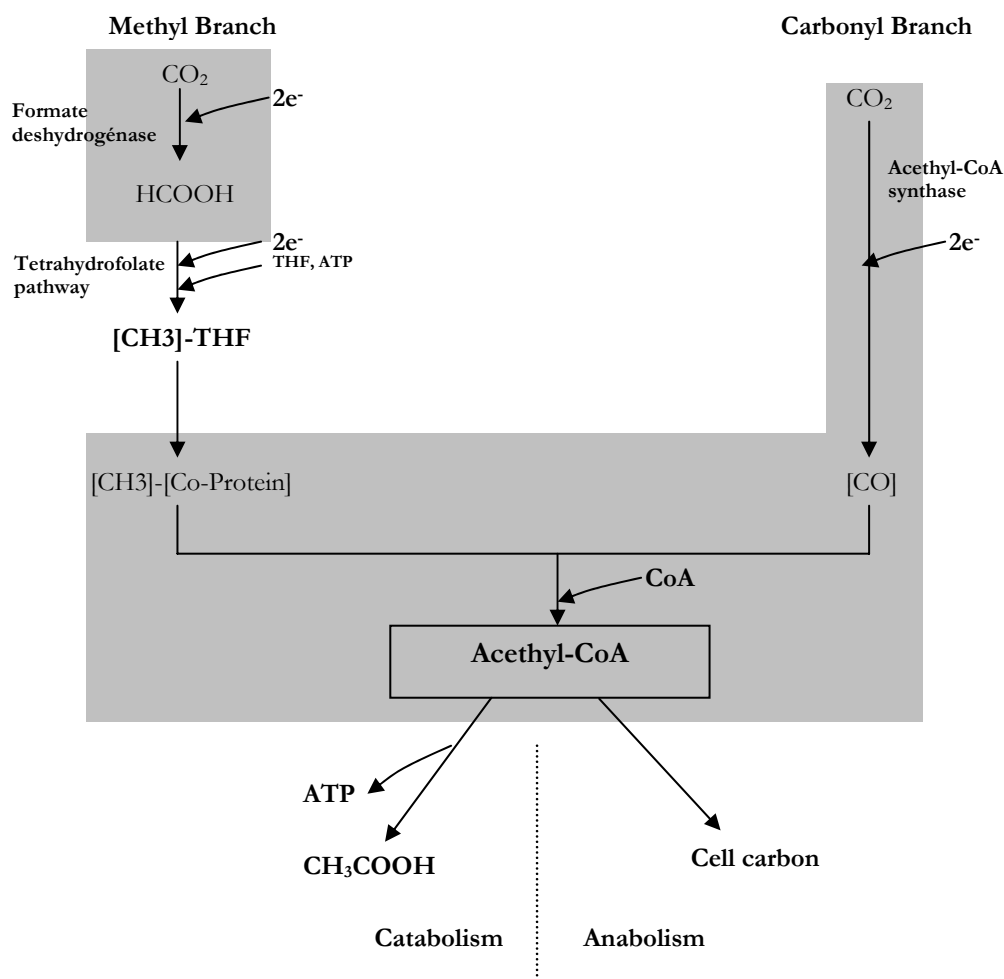


Figure 12: La voie de l'acétyl-CoA. e^- : équivalent réduit, THF : tétrahydrofolate, ATP : adenosine triphosphate, [Co-protein]: corrinoid protein, CoA : coenzyme A. D'après Drake *et al.* 2002

A ce stade de l'étude, il est difficile de spéculer sur un éventuel processus de redondance fonctionnelle (H1) ou au contraire sur un processus de coopération syntrophique (H2) au sein de ce biofilm. L'affiliation phylogénétique fine des trois souches avec des espèces cultivées peut néanmoins permettre d'émettre un certain nombre d'hypothèses quant à leurs potentialités métaboliques. L'espèce représentée par la séquence ARNr16S du clone C1 est affiliée à *Clostridium glycolicum*. Cette espèce appartient au cluster XI des *Clostridium* (Drake *et al.* 2002) et est rapportée dans la littérature comme une espèce acétogène (Drake *et al.* 2002). L'abondance relative de la bande 1, représentative de cette espèce, sur le profil TTGE, suggère que cette dernière est dominante et participe ainsi majoritairement à la production d'acétate.

Le processus d'acétogénèse, largement distribué au sein du domaine des *Eubacteria*, a également été mis en évidence chez certaines espèces sulfato-réductrices du genre *Desulfotomaculum* (Tasaki

et al. 1992, 1993). Les espèces affiliées au genre *Desulfotomaculum* sont définies par leur activité sulfato-réductrice, la présence de spores, et présentent une forte versatilité physiologique. Certaines espèces sont autotrophes, d'autres croissent par fermentation du glucose ou de substrats organiques (Staeckebrand *et al.* 1997), et certaines sont homoacétogènes en convertissant H_2/CO_2 et autres substrats en acétate (Klemps *et al.* 1985). *D. Guttoideum*, seule espèce représentante du cluster III du genre *Desulfotomaculum* (Staeckebrandt *et al.* 1997) est fortement affiliée à certains membres du cluster XIV des *Clostridium* (Collins *et al.* 1994) incluant *C. celerescens* et *C. xylanolyticum*. Une re-investigation des propriétés phénotypiques de *D. guttoideum* par Staeckebrandt *et al.* (1997) n'a pas révélé de propriété sulfato-réductrice mais une activité fermentative et la capacité de réduire les sulfites en thiosulfates. Dans le cadre de cette étude, l'activité acétogène de la souche C3 affiliée à *D. guttoideum* est probable mais ne peut rester, compte tenu des résultats actuels, que spéculative. L'augmentation de l'intensité de la bande 2 suggère néanmoins que la disparition du formate à partir de T3, permet à la souche C3 d'être plus compétitive en utilisant comme substrat H_2/CO_2 .

La troisième souche (C2) est affiliée à *Clostridium bifermentans* DPH1, dont la capacité acétogène n'a pas été démontrée. La souche *C. bifermentans* DPH1 a été isolée d'un environnement contaminé au tetrachloroéthylène (Chang *et al.* 2000) et sa capacité à déchlorer des composés aliphatiques halogénés a été démontrée. Il est également notable que la souche C1 est affiliée à *C. glycolicum* ZF5 également rencontrée dans un environnement contaminé au 2,4,6-trichlorophenol (Breitenstein *et al.* 2001).

Si cette étude, très préliminaire, ne permet pas d'établir un schéma mécanistique du fonctionnement de ce biofilm, elle ouvre néanmoins un certain nombre de perspectives intéressantes. L'agrégation cellulaire observée durant les premières étapes de la phase planctonique (T0 à T2) suggère qu'un contact étroit doit être établi entre les différentes cellules et fournit l'opportunité d'étudier ces processus d'agrégation. Les associations microbiennes au sein de biofilm constituent en effet une fraction non négligeable (voire majoritaire) de la biomasse microbienne dans les écosystèmes naturels. Si Claude Zobel (1943) nota pour la première fois la préférence des bactéries marines à croître sur des surfaces, le groupe de Costerton a étendu ces observations aux systèmes aquatiques continentaux ainsi qu'à une variété d'écosystèmes microbiens (Costerton *et al.* 1994). D'autre part, l'étude des acétogènes revêt un intérêt tout particulier dans l'étude du réseau trophique anaérobie. En effet, dans les environnements anoxiques, les acétogènes sont impliquées dans un vaste réseau d'interactions syntrophiques et compétitives. Elles sont en ainsi en compétition avec des espèces bactéries fermentatives primaires et secondaires pour l'acquisition, respectivement, des monomères et des produits de

fermentation. Dans le cas de l'hydrogène, les acétogènes sont également compétitrices des bactéries ferro-réductrices, sulfato-réductrices et des *Archaea* méthanogènes (Drake *et al.* 2002).

L'acétate peut, comme nous l'avons vu précédemment, constituer un des principaux précurseurs de la méthanogénèse dans la strate anoxique du Lac Pavin. Ainsi, l'analyse de ce biofilm peut être intégrée à l'étude de la chaîne trophique anaérobie du Lac Pavin, notamment *via* les interactions métaboliques de ces espèces avec des méthanogènes de cette strate profonde. Actuellement nos travaux sont orientés vers l'isolement de chacune de ces souches afin d'analyser leurs comportements respectifs en culture pure et en coculture. Ces études permettront de répondre aux hypothèses H1 et H2 formulées précédemment, et le cas échéant (si H1 vérifiée) de fournir un bon modèle d'étude du phénomène de redondance fonctionnelle dont nous avons suggéré l'importance dans la zone anoxique de l'écosystème Pavin dans la première partie de ce travail (Article 1).

REFERENCES

1. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D; J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
2. Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**:260-296.
3. Breitenstein, A., A. Saano, M. Salkinoja-Salonen, J. R. Andreessen, and U. Lechner. 2001. Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member desulfitobacterium frappieri strain TCP-A. *Arch. Microbiol.* **175**:133-142.
4. Breznak, J. A., and M. D. Kane. 1990. Microbial H₂/CO₂ acetogenesis in animal guts: nature and nutritional significance. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**:309-313.
5. Bryant, M. P. 1972. Commentary on hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**:1324-1327.
6. Chang, Y. C., M. Hatsu, K. Jung, Y. S. Yoo, and K. Takamizawa. 2000. Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1. *J. Biosc. Bioeng.* **89**:489-491.
7. Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. E. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*. Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-826.
8. Costerton, J. W., Z. Leawandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, G. James. 1994. Minireview: biofilms, the customized micronich. *J. Bacteriol.* **176**:2137-2142.
9. Drake, H. L. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acethyl-CoA "Wood-Ljungdahl" pathway: past and current perspectives. In: Drake H. L. (Ed.) *Acetogenesis*, (pp. 3-60). Chapman and Hall, New York.
10. Drake, H. L., K. Küsel, and C. Matthies. 2002. Ecological consequences of the phylogeneti and physiological diversities of acetogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:203-213.
11. Drake, H. L., K. Küsel, and C. Matthies. 2006. Acetogenic prokaryotes. Accessible via le site "The Prokaryotes": <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/344/COMPLETE.htm>.
12. Drake, H. L., S. L. Daniel, K. Küsel, C. Matthies, C. Kuhner, and S. Braus-Stromeyer. 1997. Acetogenic bacteria: What are the *in situ* consequences of their diverse metabolic versatilities. *Biofactors*. **6**:13-24.

13. Humayoun, S. B., N. Bano, and J. T. Hollibaugh. 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono lake, a meromictic soda lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030-1042.
14. Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In Norris, J. R. And E. W. Ribbons (Eds.) *Methods in Microbiology* 3B, pp117-132. Academic Press, New York.
15. Jardillier, L., M. Basset, I. Domaizon, A. Belan, C. Amblard, M. Richardot, and D. Debroas. 2004. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aqua. Microb. Ecol.* **35**:259-273.
16. Klemps, R., H. Cypionka, F. Widdel, and N. Pfenning. 1985. Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* sp. *Arch. Microbiol.* **143**:203-208.
17. Ljungahl, L. G. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthetis in acetogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:415-450.
18. Ljungahl, L. G. 1994. The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis. In: Drake H. L. (ed.) *Acetogenesis*, pp. 63-87. Chapman and Hall, New York.
19. Lovell, C. R., and A. B. Leaphart. 2005. Community-level analysis: key genes of CO₂-reductive acetogenesis. *Methods in Enzymology* **397**: 454-469.
20. Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, *et al.* 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acid. Res.* **32**:1363-1371.
21. Mallet, C., and D. Debroas. 2000. Regulation of aminopeptidase activity in the sediment of a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **149**:327-335.
22. McInerney, M. J., and M. P. Bryant. 1981. Basic principles of bioconversion in anaerobic digestion and methanogenesis. In: Sofer S. S. and O. R. Zaborsky (Eds.) *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*, pp. 27-296. Plenum, New York.
23. Stackebrandt, E., C. Sproer, F. A. Rainey, J. Burghardt, O. P  uker, and H. Hippe. 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfomaculum guttoideum* and description of *Desulfomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1134-1139.
24. Stackebrandt, E., I. Kramer, J. Swiderski, and H. Hippe. 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **24**:253-258.
25. Tanner, R. S., and C. R. Woese. 1994. A phylogenetic assessment of the acetogens. In: Drake H. L. (Ed.) *Acetogenesis*, (pp. 254-269), Chapman and Hall, New York.
26. Tasaki, M., Y. Kamagata, K. Nakamura, and E. Mikami. 1992. Utilization of methoxylated benzoates and formation of intermediates by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* in the presence or absence of sulfate. *Arch. Microbiol.* **157**:209-212.
27. Tasaki, M., Y. Kamagata, K. Nakamura, K. Okamura, and E. Mikami. 1993. Acetogenesis from pyruvate by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* and differences in pyruvate metabolism among three sulfate-reducing bacteria in the absence of sulfate. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**:259-264.
28. Weisburg, W., G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
29. Wood, H. G., and L. G. Ljungdahl. 1991. Autotrophic character of acetogenic bacteria. In: Shively, J. M., and L. L. Barton (ed.) *Variations in Autotrophic Life* (pp. 201-250). Academic Press, San Diego, CA.
30. Zhilina, T. N., E. N. Detkova, F. A. Rainey, G. A. Osipov, A. M. Lysenko, N. A. Kostrikina, and G. A. Zavarzin. 1998. *Natronoincola histidinovorans* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic acetogenic anaerobe. *Curr. Microbiol.* **37**:177-185.
31. Zobel, C. E. 1943. The effect of solid surface upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* **46**:39-56.

IV. DISCUSSION GENERALE

Le second volet de ce travail de thèse porte sur l'étude de fonctions métaboliques de microorganismes de la zone anoxique du Lac Pavin. Ces études ont été conduites *via* des stratégies culturales et différents niveaux d'intégration ont été abordés : enrichissements complexes, associations multi-spécifiques (biofilm), et modèle cellulaire isolé (souche BS2). La réduction dissimilatrice du Fe (III) et l'acétogénèse ont été les deux fonctions métaboliques les plus particulièrement analysées. Néanmoins, comme souligné dans l'introduction de ce chapitre, une stratégie plus globale de culture visant la détection et l'isolement d'espèces impliquées dans des activités de sulfato-réduction, de méthanogénèse, de réduction dissimilatrice du manganèse et de dénitrification a été établie. Des microorganismes sont actuellement en croissance sur des milieux définis pour cibler ces fonctions spécifiques et la poursuite des étapes d'isolement permettra d'accroître le nombre de modèles cellulaires ou de consortia microbiens issus de la zone anoxique du Lac Pavin. Ces études ne sont pas rapportées dans ce manuscrit.

Les différents travaux présentés dans ce chapitre III nécessitent également des études complémentaires pour être finalisés. Néanmoins ces observations permettront de diriger, d'optimiser les recherches futures sur les communautés microbiennes du monimolimnion du Lac Pavin, mais également d'affiner les stratégies méthodologiques en ciblant de manière plus pertinente les microorganismes impliqués dans des processus biogéochimiques d'intérêt.

Dans cette section les principales observations réalisées sur les processus de réduction dissimilatrice du Fe (III) et d'acétogénèse seront discutées et replacées dans la problématique plus globale de la zone anoxique du Lac Pavin.

IV.A. La réduction dissimilatrice du Fe (III)

En raison de sa position d'oxydant majoritaire dans la zone anoxique du Lac Pavin (**Viollier *et al.* 1995, 1997, Michard *et al.* non publié**), le Fe (III) est supposé intervenir comme accepteur final d'électrons dans des processus métaboliques microbiens (**Lehours *et al.* 2005, Lehours *et al.* soumis**). Les études microbiologiques présentées dans les Articles IV et V apportent la confirmation de cette hypothèse, et un certain nombre d'observations peuvent être synthétisées comme suit :

- (1) Les oxyhydroxides ferriques amorphes (OHF) apparaissent préférentiellement utilisés dans les cultures d'enrichissements de BFR¹ et par la souche BS2.

¹ BFR : Bactéries ferro-réductrices

- (2) Les observations microscopiques révèlent que les microorganismes sont étroitement associés aux OHF.
- (3) Les substances humiques stimulent la réduction du Fe (III).
- (4) Les espèces bactériennes, présentes dans les enrichissements, ne sont pas affiliées à des espèces de BFR obligatoires précédemment décrites (**Lovley 2003**).
- (5) L'observation précédente suggère que des microorganismes non ferro-réducteurs obligatoires (H1²) ou des BFR non encore décrites (H2) sont impliqués dans la réduction dissimilatrice du Fe (III).
- (6) Les observations réalisées dans les enrichissements et sur la souche BS2 accréditent l'hypothèse H1 (sans exclure H2). Les résultats obtenus avec BS2 suggèrent d'autre part que l'activité ferro-réductrice procure aux microorganismes non-ferro-réducteurs obligatoires un avantage énergétique et donc écologique.
- (7) Dans les cultures d'enrichissement de BFR, le fumarate apparaît être un donneur d'électrons préférentiel suggérant que les voies cataboliques empruntées à partir de ce composé confère une efficacité supplémentaire au microorganisme ou que cet élément constitue un substrat non compétitif.
- (8) Des accumulations significatives de Fe (II) ont été notées dans les enrichissements où le méthane constituait la seule source de carbone et d'énergie.
- (9) La réduction du Fe (III), accrue dans la plupart des conditions de croissance sous incubation H₂ (et avec H₂ comme seul donneur d'électrons) est en accord avec les études antérieures (**Lovley et Philipps 1986, Lovley 2003**), alors qu'aucune accumulation significative de Fe (II) n'a été notée dans les enrichissements supplémentés en acétate (Article IV) bien que ce métabolite soit l'un des principaux précurseurs de la réduction dissimilatrice du Fe (III) dans les écosystèmes sédimentaires. (**Lovley et Phillips 1989, Lovley 2003**).

IV.A.1. Formes de Fe (III) (1) (2) (3)

■ Le Fe (III), présent dans l'environnement depuis les formes solubles aux formes les plus cristallines (géothite, magnétite, hématite, akaganeite), est principalement utilisé par les microorganismes sous la forme d'oxydes faiblement cristallins (**Lovley 2003**) avec laquelle nous avons supplémenté nos cultures (OHF). Certains auteurs ont également suggéré que le Fe (III) soluble chélaté à la matière organique [Fe(III)-citrate ou Fe(III)-NTA] était plus rapidement réduit par les microorganismes en culture (**Lovley 2003**). Cependant, aucune stimulation de la réduction du Fe (III) n'a été observée dans nos enrichissements supplémentés en Fe (NTA). Un "effet

² H1, H2 : Hypothèses 1 et 2

retard" dans la réduction de cette forme chélatée [et parfois aucune réduction (résultats non présentés)] a également été noté dans les cultures BS2 (Pré-Article V). La toxicité potentielle de ce composé sur les microorganismes à des concentrations proches de celles utilisées (≥ 10 mM), peut expliquer ces observations.

■ La disponibilité du Fe (III) est un facteur majeur contrôlant l'oxydation de la matière organique lorsque cet élément est utilisé comme accepteur final d'électrons (**Lovley 1987**). Les minéraux Fe (III) sont fortement insolubles (**Schwertmann et Fitzpatrick 1992**) aussi, les microorganismes ne présentant pas la capacité de sécréter des chélateurs ou des navettes électroniques (*Cf.* Partie III revue bibliographique) doivent adhérer avec les particules de Fe (III). Les observations microscopiques des enrichissements (*Figure C.19*) et de la souche BS2 (Pré-Article 5) suggèrent que dans les conditions de culture supplémentées en OHF, les microorganismes sont effectivement étroitement associés aux oxydes Fe (III).

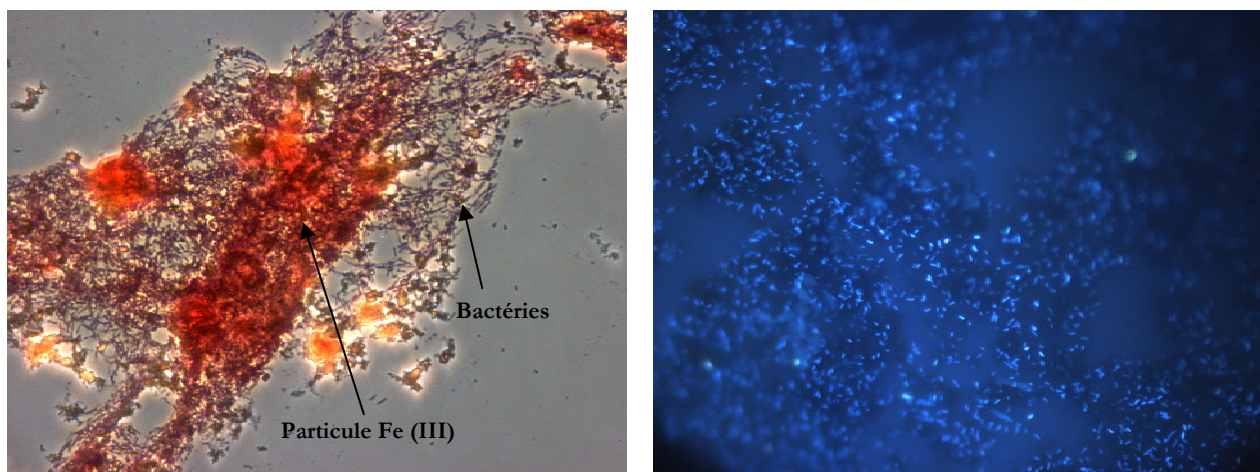


Figure C.19: Photographies des enrichissements sous H_2 avec OHF comme forme de Fe (III) (DF36, Pré-article IV). (A) Coloration de Gram. (B) coloration DAPI (les zones sombres correspondent aux particules OHF) sur lesquelles une agglomération de microorganismes est notée.

Le contact étroit avec les minéraux Fe (III) insolubles implique des contraintes constituant des facteurs limitants ne s'exerçant pas sur les compétiteurs potentiels des BFR (BSR, méthanogènes, *etc.*). Une stimulation de la réduction du Fe (III) a été notée dans les cultures BS2 en présence de substances humiques. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur les concentrations en substances humiques dans le monimolimnion du Lac Pavin, néanmoins ces dernières doivent être abondantes comme dans tous les écosystèmes naturels. Ainsi, une alternative probable à l'attachement aux oxydes Fe (III) serait l'utilisation de substances humiques comme accepteurs intermédiaires d'électrons. L'utilisation de ces dernières, qui stimulent fortement l'oxydation de la MO couplée à la réduction du Fe (III) (**Lovley et Blunt-Harris 1999**), n'est en effet pas l'apanage

des BFR obligatoires, mais a été mise en évidence chez une variété d'espèces fermentatives (**Benz et al. 1998**).

De nombreuses hypothèses peuvent ainsi être émises quant aux formes de fer préférentiellement utilisées et quant à l'implication potentielle des substances humiques dans cette réduction dissimilatrice. Il apparaît ainsi que l'optimisation des enrichissements nécessite de déterminer les formes ferriques (degré de cristallinité, *etc.*) présentes dans la zone anoxique du lac Pavin, ainsi que les concentrations en substances humiques. L'optimisation des cultures passe également par la purification de ces substances et leur introduction dans les milieux d'enrichissements.

IV.A.2. Espèces impliquées et Métabolismes alternatifs (4) (5) (6)

■ Les premières données acquises sur la structure et la diversité des communautés microbiennes du monimolimnion du Lac Pavin par les analyses de "clonage-séquençage" (Article 3), n'avaient pas révélé la présence de microorganismes affiliés à des familles de BFR obligatoires (*Geobacteraceae*, *etc.*). A l'issu de ces premières observations, deux hypothèses avaient été formulées. La première suggérait que certaines BFR³ obligatoires pouvaient être présentes dans cette strate anoxique mais que ces microorganismes non encore détectés dans d'autres écosystèmes ne figurent pas en conséquence dans les banques de données. La seconde hypothèse, non exclusive de la première, postulait que la réduction dissimilatrice du Fe (III) pouvait être (en partie) la résultante de l'activité de microorganismes non ferro-réducteurs obligatoires (BSR⁴ ou fermentatives) utilisant cette voie comme processus métabolique alternatif. Si aucune donnée ne nous permet de valider la première hypothèse, certains résultats des cultures *in vitro* accréditent la seconde. Deux espèces affiliées à l'ordre des *Desulfovibrio* ont été détectées dans des enrichissements pour lesquels des concentrations croissantes en Fe (II) ont été notées. Sur la base des profils TTGE, ces deux espèces, apparaissent dominer ces conditions de croissance spécifiques (milieu ME, fumarate et H₂ comme donneurs d'électrons). N'ayant pu réaliser les isollements de ces deux espèces, il ne peut être affirmé avec certitude qu'elles participent à la réduction dissimilatrice du Fe (III). Néanmoins notre hypothèse suggérant l'implication de BSR dans la réduction dissimilatrice du Fe(III) est cohérente avec des études antérieures montrant la capacité de certaines espèces de *Desulfovibrio* à utiliser le Fe (III) comme accepteur final d'électrons (**Jones et al. 1984, Lovley et al. 1993, Lovley 2003**).

La majorité des séquences ARNr16S des espèces présentes dans les cultures, pour lesquelles une accumulation significative de Fe (II) a été notée, sont affiliées aux *Proteobacteria* et aux bactéries

³ BFR : Bactéries ferro-réductrices

⁴ BSR : Bactéries sulfato-réductrices

Gram-positives (*Firmicutes* et *Actinobacteria*). Certaines séquences ont notamment été affiliées aux genres *Pseudomonas* et *Aeromonas* au sein desquels de nombreuses espèces réalisent la réduction dissimilatrice du Fe (III) en conditions anaérobies (**Lonergan *et al.* 1998, Lovley *et al.* 2003**). L'étude *in vitro* de nos isolats, notamment DF32 (non décrit dans cette thèse), affilié à *Clostridium mettaloalevans*, et la souche BS2 proche de *C. saccharobutylicum*, confirment la capacité de certaines espèces fermentatives de la zone anoxique du lac Pavin à assurer la réduction dissimilatrice du Fe (III). Le comportement de la souche BS2 révèle en outre que la réduction dissimilatrice du Fe (III) lui confère un avantage écologique certain.

■ Les analyses phylogénétiques des microorganismes de la zone anoxique du Lac Pavin (Article III) avaient également mis en évidence qu'un nombre important de clones présentait des parentés marquées avec des clones issus d'environnements contaminés par des solvants chlorés ou des hydrocarbures aromatiques. Cette observation surprenante, nous avait conduit à formuler l'hypothèse que le lien pouvait être la réduction dissimilatrice du Fe (III). En effet, les propriétés de déchlorination et d'oxydation de composés aromatiques sont fréquemment rapportées chez les BFR (**Lovley 2003**). Dans les enrichissements où une réduction notable de Fe (II) est observée (Article 4), des séquences ADN_r16S affiliées notamment aux *Spirochaetes* et aux *Epsilon-Proteobacteria* sont incluses dans des groupes de bactéries rencontrées dans des environnements contaminés par les métabolites cités précédemment (*Sulfospirillum halorespirans* (**MacBeth *et al.* 2004**), clusters SJA et WCHB (**Von Wintzingerode *et al.* 1999, Dojka *et al.* 1998**).

Ces observations suggèrent qu'il serait potentiellement intéressant de cibler des microorganismes ferro-réducteurs indirectement en recherchant des activités de déchlorination et d'utiliser des composés aromatiques comme source de carbone. Ainsi, par exemple, une analyse très préliminaire que nous avons réalisée sur la souche BS2 en utilisant le N-(3,4-dichlorophényl)-N',N'-diméthylurée comme source de carbone et le Fe (III) comme accepteur potentiel d'électrons a révélé que ce composé pouvait être utilisé par cette espèce dans des proportions significatives (jusqu'à -60%). Ces premiers résultats indiquent en outre l'existence d'activités potentiellement "bioremédiatrices" au sein des communautés anaérobies du Lac Pavin.

IV.A.3. Sources de carbone et d'énergie (7) (8) (9)

■ De nombreuses études ont révélé que l'H₂ constituait un donneur d'électrons préférentiel dans le processus de réduction dissimilatrice du Fe (III) (**Lovley et Goodwin 1988, Lovley *et al.* 1994, Caccavo *et al.* 1992, Lovley 2003**). Les résultats obtenus sur les enrichissements suggèrent que ce métabolite peut effectivement intervenir dans la réduction du Fe (III) dans la zone

anoxique du Lac Pavin. Ainsi, établir un profil des concentrations en H_2 pourrait être une démarche pertinente afin de définir les zones prédominantes de réduction du Fe(III). Il existe en effet, dans les environnements en état de "steady-state" (comme le monimolimnion du Lac Pavin) une gamme de concentrations en H_2 pour laquelle la réduction du Fe (III) constitue le principal TEAP⁵ (Lovley 2003).

■ Le fumarate est fréquemment utilisé par des microorganismes anaérobies comme accepteur final d'électrons (respiration fumarate) (Van Kuijk *et al.* 1998). Si dans les environnements relativement oligotrophes, comme la zone anoxique du Lac Pavin, il est probablement plus bénéfique de dévier ce composé organique vers des processus cataboliques, l'utilisation préférentielle du fumarate constitue néanmoins un résultat "surprenant". Analyser cette "préférence" métabolique sur la base de ces études préliminaires serait extrêmement spéculatif. Néanmoins une base de réflexion sur laquelle nous pouvons nous appuyer pour poursuivre ces analyses est que l'utilisation du fumarate peut constituer une voie catabolique énergétiquement plus favorable. En effet, certaines étapes comme l'oxydation du succinate en fumarate sont limitantes étapes car fortement endergoniques ($\Delta G > 0$, Tableau C.9).

Réaction globale	ΔG°
Propionate + $3H_2O \rightarrow$ acetate ⁻ + HCO_3^- + $3H_2$	+76.1
<hr/>	
Etapas de la reaction	+ 20.5
Propionate + $HCO_3^- \rightarrow$ succinate ²⁻ + H_2O	+86.2
Succinate ²⁻ \rightarrow fumarate ²⁻ + H_2	-3.7
Fumarate ²⁻ + $H_2O \rightarrow$ malate ²⁻	+47.7
Malate ²⁻ \rightarrow oxaloacétate + H_2	-27.2
Pyruvate + $2H_2O \rightarrow$ acétate ⁻ + HCO_3^- + H^+ + H_2	-47.3

Tableau C.9 : exemple des étapes de l'oxydation du propionate (voie du méthylmalonyl CoA, d'après Stams *et al.* 1993)

L'oxydation du fumarate constitue quant à elle une réaction endergonique ($\Delta G < 0$) ne nécessitant pas l'implication d'un partenaire hydrogénotrophe. Stams *et al.* (1993) ont ainsi montré que la souche *Desulfovibrio* G11 présentait des taux de croissance supérieurs *via* l'oxydation du fumarate qu'en utilisant le propionate. Cette souche G11 oriente également préférentiellement son métabolisme vers l'oxydation du fumarate plutôt que vers sa réduction. Les produits finaux résultant de l'oxydation du fumarate par la souche G11 sont l'acétate et le succinate, métabolites que nous avons détectés dans les cultures de l'un de nos isolats (DF32, résultats non présentés).

⁵ TEAP : Terminal electron accepting process

■ Une accumulation de Fe (II) a été notée dans les enrichissements pour lesquels le CH₄ constituait la seule source de carbone et d'énergie. Compte tenu de l'hypothèse initiale d'un éventuel couplage entre l'oxydation anaérobie du CH₄ et la réduction du Fe (III) dans la zone anoxique du Lac Pavin (*cf.* Chapitre I et II), ces observations sont particulièrement intéressantes. Néanmoins, aucun des microorganismes en croissance dans ces conditions de culture n'a été isolé à ce jour.

Afin de poursuivre l'investigation de ce processus putatif, des cultures en chimostat (Figure C.20) ont été réalisées au Laboratoire de Biologie des Protistes en collaboration avec le Laboratoire de Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix. Ces réacteurs sont pressurisés sous CH₄ (1.5 bar) et incubés à 20°C. Après des durées d'incubations relativement longues (>10 mois), une diminution des concentration en méthane (jusqu'à -50%), et des densités cellulaires élevées ont été notées.



Figure C.20: Chimostats utilisés pour étudier le processus putatif de réoxydation anaérobie du méthane dans la zone anoxique du Lac Pavin.

Ces expérimentations se poursuivent actuellement, et si les premières observations suggèrent que le méthane peut être consommé dans ces conditions anaérobies, l'existence d'artefacts expérimentaux résultants essentiellement des longues périodes d'incubations doivent être également pris en considération.

L'analyse de la composition isotopique du carbone dans des biomarqueurs spécifiques sera une démarche nécessaire pour confirmer ces observations préliminaires.

■ L'acétate est un des principaux précurseurs de la réduction dissimilatrice du Fe (III) dans les écosystèmes sédimentaires (Lovley 2003). Aucune accumulation significative de Fe (II) n'a cependant été notée dans les enrichissements BFR supplémentés avec ce donneur d'électrons (pré-Article IV). La compétition active entre BFR et méthanogènes pour l'acquisition de ce métabolite est fréquemment à l'origine d'une inhibition complète de la méthanogénèse dans les sols anaérobies et les sédiments où les oxydes ferriques sont abondants (Lovley et Phillips 1987, Roden et Wetzel 1996, 2003). Dans la zone anoxique du Lac Pavin, les *Archaea*, essentiellement

représentées par des méthanogènes affiliées aux *Méthanosarcinales* et plus particulièrement à l'ordre des *Methanosaeta* (Article I et III) dominent les communautés microbiennes. Ces méthanogènes, affiliées à un groupe d'*Archaea* acétoclastes (Garcia *et al.* 2000), sont présentes et actives en dépit de concentrations élevées en Fe (III). Une hypothèse pouvant ainsi être formulée est que l'acétate est le précurseur de la méthanogénèse dans la zone anoxique du lac Pavin et serait ainsi peu ou pas utilisé pour la réduction dissimilatrice du Fe (III). L'inhibition directe des méthanogènes par le Fe (III) (Bodegom *et al.* 2004), moins accentuée chez les espèces acétotrophes, notamment chez *Methanosaeta concilii*, pourrait expliquer que les méthanogènes de la zone anoxique du Lac Pavin soient dominées par des acétotrophes affiliées à cette espèce, bien que l'oxydation acétoclastique constitue la voie métabolique énergétiquement peu favorable (Garcia *et al.* 2000).

IV.A.4. Conclusions

De l'ensemble de notre étude, il ressort que la réduction dissimilatrice du Fe (III) est un métabolisme important dans le monimolimnion du Lac Pavin. Il apparaît assuré par une communauté microbienne diverse et reposé sur des mécanismes complexes dont l'élucidation doit être poursuivie. Cette dernière ne peut être réalisée que dans le cadre d'une forte interdisciplinarité associant des microbiologistes, des chimistes et des géochimistes. Ce domaine de recherche ouvre un large champ d'investigation au plan fondamental (propriétés physiologiques des microorganismes, caractérisation des enzymes et des transporteurs, *etc.*), en écologie (implication de ce groupe métabolique dans les flux de carbone et d'énergie) et au plan des applications (bioremédiation, association putative avec l'oxydation anaérobie du méthane, *etc.*).

IV.B. L'acétogénèse

En raison du rôle central de l'acétate dans la chaîne trophique anaérobie et de son implication potentielle comme principal précurseur de la méthanogénèse, l'étude de l'acétogénèse est essentielle dans la zone anoxique du Lac Pavin. Le biofilm que nous avons isolé en culture peut permettre d'établir les premières bases de ces études. Ces dernières qui doivent être largement poursuivies devront également intégrer des analyses *in situ* de l'occurrence des acétogènes dans la colonne d'eau du Lac Pavin. Au vu de la disparité phylogénétique de ce groupe, cibler les enzymes impliquées dans la voie de l'acétyl-CoA sera probablement la démarche méthodologique la plus pertinente.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Longtemps relégués au second plan, les microorganismes inféodés aux zones anoxiques des environnements naturels font l'objet d'investigations de plus en plus nombreuses. Les perspectives écologiques ainsi que les applications biotechnologiques potentielles, que laissent entrevoir la variété des réactions bioénergétiques catalysées par ces organismes, ouvrent des champs d'investigations particulièrement stimulants. Ainsi, certains processus, de découverte récente, comme l'oxydation anaérobie du méthane ou de l'ammonium soulèvent un intérêt grandissant de la communauté scientifique. Cet engouement permet la multiplication des investigations sur le bacterioplancton anaérobie des écosystèmes naturels, et aboutit à une littérature de plus en plus prolifique sur ces communautés, tant sur des aspects d'écologie descriptive que fonctionnelle.

Le travail présenté dans ce manuscrit a trait aux communautés microbiennes des zones anoxiques pélagiques de deux écosystèmes lacustres, et a été conduit en regard de différents objectifs. L'étude réalisée sur le bacterioplancton anaérobie du Lac d'Aydat s'inscrit dans un cadre d'écologie fondamentale et s'assume ainsi descriptive. Elle révèle notamment l'excellent modèle que constitue la biocénose procaryotique anaérobie d'écosystèmes lacustres périodiquement stratifiés pour l'application de concept d'écologie générale, comme celui des successions des communautés. En effet, le temps de réponse court des communautés bactériennes à la perturbation "anoxie", a permis de mettre en évidence un processus graduel d'évolution de la composition de ces dernières dans l'hypolimnion du Lac d'Aydat. Ces observations sont ainsi en accord avec la théorie proposée par **Margalef (1958)** qui stipule que les écosystèmes évoluent spontanément et selon des modalités précises dans le sens d'une complexification croissante de leur organisation. Si cette étude revêt un caractère quelque peu annexe en regard du travail global conduit durant cette thèse, elle devra néanmoins être poursuivie sur la base des perspectives qui ont été définies dans la discussion du chapitre I.

Dans cette discussion générale, seuls les principaux résultats acquis sur la biocénose de la zone anoxique du Lac Pavin qui a constitué notre principal objet d'étude seront pris en compte. Cette section sera organisée comme suit : les principaux résultats seront confrontés aux hypothèses formulées aux prémices de cette étude, puis, seront secondairement développées les perspectives offertes par la continuité de ce travail.

I- CONCLUSIONS

Le monimolimnion du Lac Pavin, écosystème original s'il en est, peut selon une vision anthropocentrique être considéré comme "extrême". Aussi, entreprendre l'étude de la biocénose anaérobie de ce biotope représentait une perspective particulièrement stimulante qui a nécessité une construction progressive de stratégies d'investigations. Aux prémices de ce travail, l'idée générale était que les microorganismes inféodés à cette zone profonde devaient présenter un fort particularisme génotypique et phénotypique. Cette hypothèse initiale a été confirmée, dans un premier temps, par les études conduites *in situ*. Ces dernières ont mis en évidence que, contrairement à certaines idées préconçues, la diversité des communautés anaérobies est largement comparable à celle observée dans les zones aérobies d'écosystèmes lacustres. Cette remarquable biodiversité est renforcée par une stratification verticale du bacterioplancton anaérobie traduisant une potentielle spécialisation des communautés en relation avec le gradient physico-chimique. Les analyses phylogénétiques conduites sur ces communautés ont révélé que la grande majorité des espèces, représentées par leurs séquences ADN_r16S, étaient très éloignées de celles pouvant être rencontrées dans d'autres écosystèmes anoxiques. Si cette divergence taxonomique reflète l'originalité des communautés anaérobies du Lac Pavin, elle ne permet pas, dans la très grande majorité des cas, de spéculer sur d'éventuelles propriétés métaboliques. Néanmoins, une affiliation étroite avec des espèces caractérisées a été notée pour un petit nombre de séquences. Il apparaît ainsi probable que la limite supérieure de la chémocline est le siège d'une activité microbienne méthanotrophe aérobie, pouvant potentiellement conduire à une réoxydation du méthane. L'identification de séquences affiliées à des bactéries ferro-oxydantes dans cette strate supérieure suggère une implication de la fraction biologique dans la réoxydation de cet élément.

Les approches d'hybridation *in situ* et de clonage séquençage ont également permis de mettre en évidence la présence de bactéries sulfato-réductrices affiliées à la sub-division *delta-Proteobacteria*, et plus particulièrement aux genres *Desulfobubus*, *Desulfobacter* et *Desulfovibrio*. Ces dernières pourraient ainsi participer à la production d'H₂S dans cette zone profonde, notamment dans la chémocline. L'observation d'une proportion importante de séquences affiliées à la division Candidate OP11, généralement rencontrées dans des écosystèmes réducteurs caractérisés par la présence de composés soufrés comme les sulfates ou les sulfites, pourrait suggérer que ce groupe puisse être impliquer dans le cycle biogéochimique du soufre (Harris *et al.* 2004).

En dépit d'une dominance de la biocénose anaérobie de cette strate profonde par des séquences affiliées aux *delta-Proteobacteria*, aucune parenté phylogénétique étroite n'a été observée avec des familles de bactéries ferro-réductrices obligatoires de cette sub-division. L'utilisation du Fe (III) comme accepteur final d'électrons est pourtant réalisée dans ce monimolimnion comme l'indique

les expériences conduites *in vitro*. Dans ces études les espèces bactériennes impliquées dans la réduction du Fe (III), ne sont probablement pas inféodées à ce métabolisme et utilisent potentiellement cet accepteur d'électrons dans des processus métaboliques alternatifs. Ainsi l'étude conduite sur la souche fermentative BS2, révèle que l'utilisation du Fe (III) comme accepteur final d'électrons confère un avantage énergétique et donc un avantage écologique potentiel à cet organisme, et traduit probablement une adaptation de ces microorganismes à leur environnement. En raison de la position d'oxydant majoritaire du Fe (III) dans la zone anoxique du Lac Pavin, les bactéries réalisant la réduction dissimilatrice de cet élément jouent probablement un rôle prépondérant dans les flux de matière et d'énergie. D'autre part, cette activité microbienne apparaît stimulée en présence de substances humiques. Si aucune donnée n'est actuellement disponible sur les concentrations en substances humiques dans le monimolimnion du Lac Pavin, ces dernières doivent néanmoins être largement abondantes comme dans tous les écosystèmes naturels. Leur utilisation comme accepteurs intermédiaires d'électrons pourrait ainsi leur conférer un rôle prépondérant dans la réduction du Fe (III) au sein de cette zone profonde. Les études conduites *in vitro* ont également révélé que les oxyhydroxydes de Fe(III) sont préférentiellement réduits *via* un couplage avec des donneurs d'électrons différents de ceux rapportés dans la littérature (à l'exception de H₂). Ainsi, si le fumarate apparaît être un donneur préférentiel d'électrons, aucune activité notable de réduction du Fe (III) n'a été notée en présence d'acétate. Au vu des résultats des études *in situ*, il apparaît que l'acétate pourrait être un des principaux précurseurs de la méthanogénèse, et serait ainsi potentiellement utilisé au cours de ce métabolisme. En effet, les communautés d'*Archaea*, peu diversifiées, sont dominées par les *Methanosarcinales* et en particulier par des espèces affiliées aux *Methanosaeta* comme le révèle les résultats des approches d'hybridation *in situ* et de clonage-séquençage. Les concentrations en méthane sont ainsi positivement corrélées avec les densités de ces méthanogènes dont les représentants connus sont des acétoclastes obligatoires. L'acétate qui semble être formé, pour partie *via* la voie de l'acéthyl CoA, est probablement la résultante de l'activité de plusieurs espèces de *Clostridium* ou affiliées, comme nous avons pu le suggérer dans l'étude conduite sur le biofilm acétogène isolé de la strate anoxique du Lac Pavin.

Il est d'ailleurs particulièrement notable que la plupart des espèces isolées en culture pure ou en consortia soient des bactéries sporulantes appartenant majoritairement au phylum des *Firmicutes*, alors que ce dernier n'apparaissait pas dominant la biocénose anaérobie dans les études conduites *in situ*. Deux hypothèses peuvent expliquer cette apparente contradiction. Les méthodes d'extraction de l'ADN génomique suffisamment stringentes pour la lyse des bactéries Gram négatives ne sont souvent pas suffisamment drastiques pour les Gram-positives et conduisent à une sous-estimation de ce groupe dans les méthodes globalisées. D'autre part si des efforts ont été

réalisé pour optimiser les conditions de culture, il est probable que la dominance des sporulantes soit le reflet de la nécessité de développer des stratégies culturales encore plus élaborées pour les espèces asporulées.

En regard des hypothèses initiales, une des voies d'investigation que nous avons souhaitée développer était l'étude d'un couplage syntrophique potentiel entre la réoxydation anaérobie du méthane et la réduction dissimilatrice du Fe (III). A l'issue de nos premières études culturales, aucun résultat ne peut définitivement accréditer cette hypothèse. Une disparition du méthane et une activité de réduction du Fe (III) concomitantes à des accroissements des densités cellulaires a bien été noté dans les cultures en batch et en chimostat. Néanmoins, il ne peut être affirmé que ce mécanisme est effectivement réalisé *via* un consortium ou une cellule individuelle, et des investigations plus poussées sont nécessaires avant de tirer des conclusions pertinentes au sujet de ce métabolisme.

En conclusion, les résultats acquis au cours de ce travail ont permis une caractérisation de la structure, de la diversité et de la phylogénie des communautés anaérobies du Lac Pavin et ainsi d'accéder à une première "image" de ces dernières. Ces données acquises *via* des approches moléculaires *in situ* ont été complétées par des études métaboliques *in vitro* et par l'isolement de souches modèles. Si le couplage de ces approches apparaît une voie d'étude pertinente et à poursuivre, il sera également nécessaire d'inclure dans les prochaines analyses des méthodologies d'investigation rétroactives.

II- PERSPECTIVES

Vaste champ d'investigations, la zone anoxique du Lac Pavin révélera, probablement, progressivement ses "secrets". Ayant suscité de longue date un intérêt notable pour les études en géochimie, cet écosystème apparaît être un excellent modèle d'études intégrées d'écologie microbienne. Les conditions drastiques prévalant dans cette strate profonde conduisent à une "simplification" des facteurs de régulation agissant sur la biocénose anaérobie. En effet, les conditions aphotiques, psychrophiles, anoxiques, *etc.* de cette strate impliquent une dominance hégémonique des microorganismes procaryotes et des virus. Les études conduites au Laboratoire de Biologie des Protistes (Jonathan Colombet, Thèse en cours sous la direction de T. Sime Ngando) qui ont mis en évidence de fortes densités virales ont cependant révélé que, dans cette strate profonde, la lyse virale ne constituait pas au même titre que la prédation par les flagellés hétérotrophes des facteurs dominants de contrôle des communautés microbiennes (étude à long

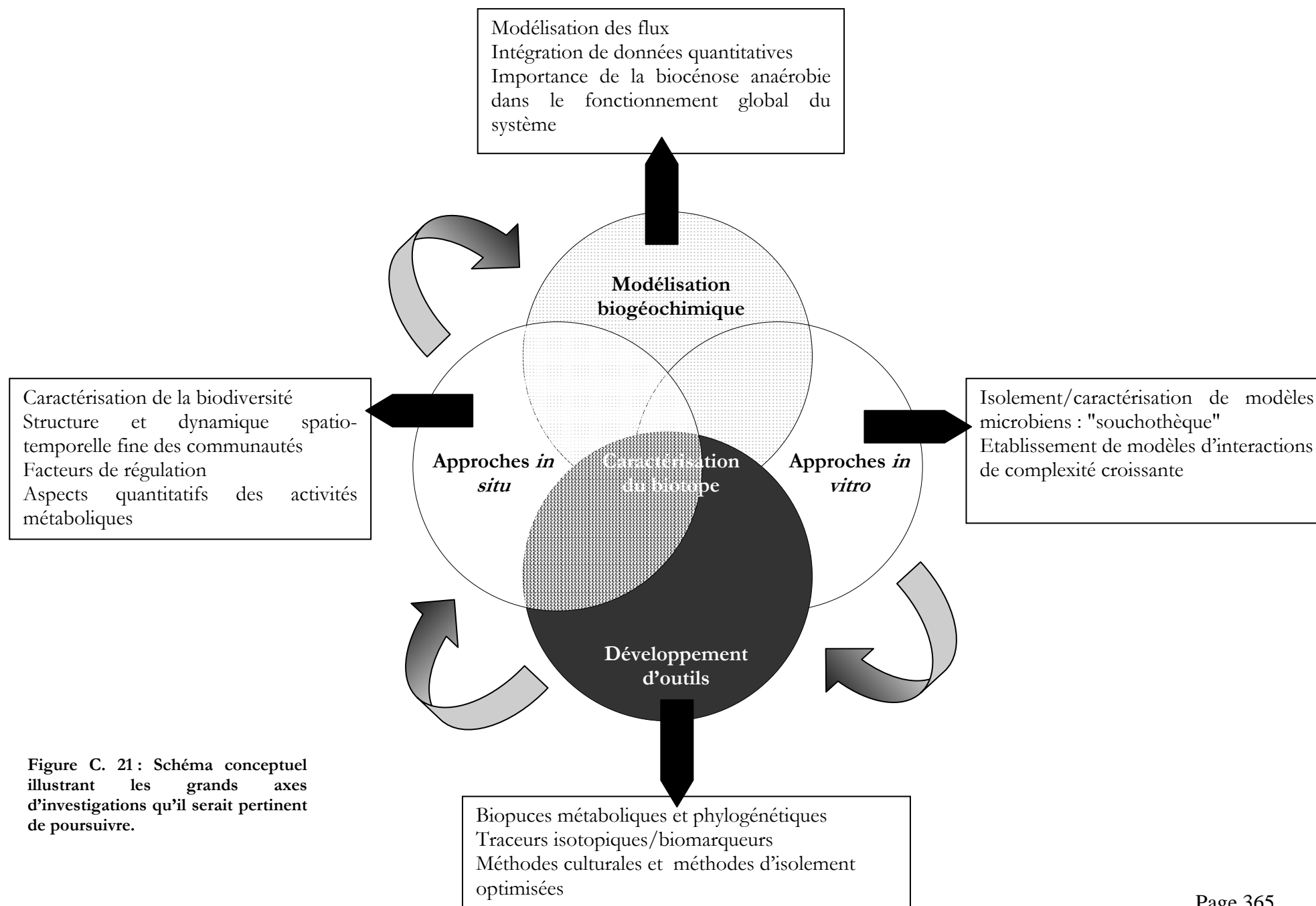


Figure C. 21 : Schéma conceptuel illustrant les grands axes d'investigation qu'il serait pertinent de poursuivre.

terme sur un cycle saisonnier). D'autre part, les éléments nutritifs classiques (P, N, *etc.*) et le carbone organique dissous n'apparaissent pas constituer des éléments limitant la croissance microbienne. La question pouvant donc légitimement se poser est : *Comment ces communautés microbiennes non soumises à des facteurs de régulation de type "bottom-up" ou "top-down" se comportent dans un environnement maintenu en état de "steady state" ?* On peut considérer que le confinement de la zone anoxique du Lac Pavin a permis aux communautés microbiennes d'accéder au stade final des successions écologiques : le climax. Ainsi, la quantité d'informations accumulées serait suffisante pour permettre au système une indépendance vis à vis des fluctuations du milieu par une augmentation des capacités de régulation homéostatique. Une hypothèse, certes spéculative, qui peut être avancée est qu'outre les facteurs liés aux mécanismes physiologiques internes (Quorum Sensing, énergie de maintenance, rendements de croissance, affinité pour le substrat, *etc.*), le contrôle de l'activité et de la croissance pourraient être exercé *via* les cycles redox. Ainsi, par exemple, une bactérie réduisant le fer est dépendante de la disponibilité de la forme oxydée de cet élément et son activité doit être compatible avec le cycle de ce composé. **L'analyse des cycles redox, la connaissance et la caractérisation des facteurs abiotiques** au sein de cette strate apparaissent donc une nécessité première afin de comprendre les facteurs régissant la dynamique des communautés microbiennes. Ainsi, au centre du schéma conceptuel ([Figure C.21](#)) résumant les différentes stratégies d'investigation proposées pour la poursuite de ces études se place la caractérisation des composantes abiotiques. L'acquisition et l'interprétation de ces données si elle revêt un caractère indispensable sur l'ensemble du monimolimnion, doivent être particulièrement affiner dans les zones de fort gradient physico-chimique (oxycline et chémocline) au niveau desquelles la majorité des éléments d'intérêt (Fe, Mn *etc.*) sont réoxydés. D'autre part une connaissance fine de l'environnement dans lequel évoluent les microorganismes anaérobies est une étape primordiale pour l'élaboration de méthodes culturales optimisées. Ainsi, un des principaux axes de recherche qu'il sera important de poursuivre est l'étude de l'implication des bactéries dans la réduction dissimilatrice du Fe (III). A cette fin, la détermination des structures et des formes d'oxydes de fer, de la concentration et de la composition des substances humiques au sein de ce monimolimnion est primordiale. Ces connaissances pourront apporter des bases essentielles à l'isolement et à la caractérisation de souches ou de consortia microbiens dans l'objectif de reconstruire *in vitro* des modèles d'interactions de plus en plus complexes. Si ces isollements doivent être particulièrement ciblés sur les bactéries réalisant la réduction dissimilatrice du Fe (III), l'élaboration d'une "souchothèque" intégrant des microorganismes présentant différentes fonctions métaboliques est d'autre part nécessaire.

Ainsi, parallèlement à l'acquisition des données physiques, chimiques et géochimiques actuellement réalisées dans le cadre d'un projet multidisciplinaire [Projet ANR METANOX], notamment par le

Laboratoire de Géochimie de Eaux (Paris VII), le développement de nouvelles approches de culture *in vitro* apparaît essentielle particulièrement pour l'isolement de souches microbiennes dominant les biocénoses procaryotiques mais dont les fonctions sont inconnues. Ainsi, un des défis majeurs à relever, qui est également celui de nombreux écologistes microbiens, est d'accéder à des caractérisations de membres de Division Candidate. En effet les séquences ADN_r16S des membres de la Division Candidate OP11, largement représentées dans les bibliothèques de clones, occupent potentiellement une position clé au sein du réseau trophique anaérobie. Pleinement conscient de la difficulté que revêt cet objectif, il n'en demeure pas moins que ce dernier est essentiel à la compréhension des processus microbiens dans cette strate profonde. Pour ce faire, si les procédures d'isolement par encapsulation GMD (Zengler *et al.* 2002, cf. Partie I Revue Bibliographique) sont des stratégies prometteuses, leur adaptation à la culture anaérobie nécessitera un certain nombre d'étapes supplémentaires. Aussi afin d'isoler des membres de clades "récalcitrant à la culture" une stratégie d'isolement *in situ* est actuellement en cours de développement au Laboratoire de Biologie des Protistes (Lehours, A. C., L. Jouve, G. Demeure, J. C. Romagoux, G. Fonty).

Les approches *in vitro*, qui apparaissent en relative abstraction par rapport au milieu naturel, offriront néanmoins deux intérêts majeurs. La "dissection" de mécanismes cellulaires et l'analyse de processus interactifs de type syntrophes ou compétitifs, permettront, par extrapolation, d'interpréter des processus plus globaux. D'autre part, l'isolement de microorganismes clés ouvre la perspective d'affiner et de développer des outils adaptés à l'étude de cette biocénose. Ainsi, l'équipe de Génomique Intégrée des Interactions Microbiennes (P. Peyret et ses collaborateurs) du Laboratoire de Biologie des Protistes développe actuellement [Projet ANR METANOX], des biopuces métaboliques et phylogénétiques afin de suivre finement la dynamique des communautés microbiennes anaérobies du Lac Pavin dans le cadre de variations de paramètres environnementaux (gradient physico-chimique). Les sondes déposées sur les biopuces, dessinées sur des bases bibliographiques et à partir des premières données acquises sur cette biocénose anaérobie, pourront être en permanence réactualiser à partir des données culturelles. En effet, la littérature de ces dix dernières années laisse apparaître, comme nous l'avons précédemment souligné, que "rien n'est impossible". Ainsi, en dépit de la difficulté et du caractère chronophage que revêt l'isolement de microorganismes anaérobies de l'environnement, cette approche ambitieuse peut permettre de mettre en évidence de nouvelles voies métaboliques. D'autre part, le potentiel des séquences environnementales ne peut être exploité que si les hypothèses basées sur ces données peuvent être supportées par des études fonctionnelles chez des organismes cultivés.

L'isolement de souches utilisées comme modèles qui relève davantage d'une approche d'autoécologie est, de notre point de vue, essentielle mais ne peut seul conduire à une information

écologique pertinente. L'étude de la biocénose anaérobie du Lac Pavin doit ainsi être renforcée par l'investigation de processus métaboliques *in situ via* des voies d'investigations rétroactives (*cf. Partie I Revue Bibliographique*). Dans ce cadre, les méthodes SIP apparaissent des outils pertinents, en particulier pour poursuivre l'investigation du processus de réoxydation anaérobie du méthane. Le développement de cette méthodologie peut être inscrit dans une perspective à court terme car le couplage des biomarqueurs et des isotopes stables est une approche maîtrisée au Laboratoire de Biologie des Protistes (Alexandre Bec, Maître de conférence). L'utilisation de l'outil SIP peut également être envisagé pour analyser les flux de carbone en utilisant des composés marqués, un exemple serait son application pour déterminer le rôle potentiel de l'acétate comme précurseur de la méthanogénèse.

Compte tenu de l'originalité des communautés anaérobies du Lac Pavin, et dans le cadre de perspectives à plus long terme, la métagénomique qui marque le départ d'une nouvelle dimension dans les études de génomique microbienne apparaît comme une démarche intéressante. Cependant, cette méthodologie qui tient compte de la réelle diversité des microorganismes nécessite d'énormes moyens matériels et humains pour obtenir une information pertinente. Néanmoins, cette perspectives ne doit pas être perdue de vue et peut s'inscrire dans de larges projets combinant également des expertises transcriptomiques et biogéochimiques.

Répondre à un des objectifs de l'écologie microbienne "moderne" est également d'évaluer *via* la diversité métabolique des microorganismes de l'environnement leur implication potentielle dans des processus présentant un intérêt pour la société, comme par exemple les processus de détoxification. Aussi spéculatif que cela puisse être, peut-on d'imaginer que des microorganismes "fossiles" de la strate anoxique du Pavin puissent permettre de résoudre des problématiques très modernes ? Intuitivement (et sur la base de l'affiliation phylogénétique des séquences), il serait tentant de répondre que "oui !" Sélectionner *via* les méthodes culturales des microorganismes en utilisant, par exemple, des composés aromatiques chlorés est ainsi envisagé et peut s'inscrire dans le cadre d'études de Microbiologie Environnementale.

Un des enjeux majeurs des études complémentaires sur les communautés de la zone anoxique du lac Pavin sera de poursuivre l'analyse de la potentielle oxydation anaérobie du méthane dans cette strate profonde. En effet, ce processus, outre l'intérêt fondamental qu'il revêt, s'inscrit également dans le cadre des changements climatiques globaux de lutte contre les émissions de gaz à effet de serre.

La zone anoxique du Lac Pavin stimule l'intérêt de différentes disciplines scientifiques avec pour objectif commun la compréhension des mécanismes actant au sein de cette strate profonde. Ces approches pluridisciplinaires combinées permettront probablement à terme de modéliser les flux de carbone et d'énergie et les grands cycles biogéochimiques se réalisant dans cet écosystème (Figure C.21) mais également d'interpréter le rôle de cette strate profonde dans le fonctionnement global du système. Dans cette perspective la poursuite des études conduites sur la biocénose anaérobie est essentielle pour permettre de quantifier l'importance fonctionnelle de la fraction procaryotique anaérobie au sein de ce lac.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



RÉFÉRENCES

A

- **Abraham, W. R., C. Hesse, O. Pelz.** 1998. Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4202-4209.
- **Abram, J. W., and D. B. Nedwell.** 1978. Inhibition of methanogenesis by sulfate-reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch. Microbiol.* **117**:89-92.
- **Achenbach, L. A., U. Michaelidou, R. A. Bruce, J. Fryman, J. D. Coates.** 2001. *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:527-533.
- **Adamse, A. D., and C. T. M. Velzeboer.** 1982. Features of a *Clostridium*, strain CV-AA1, an obligatory anaerobic bacterium producing acetic acid from methanol. *Ant. V. Leeuwenhoek.* **48**:305-313.
- **Aeschbag-Hertig, W., M. Hofer, R. Kipfer, D. M. Imboden, and R. Wieler.** 1999. Accumulation of mantle gases in permanently stratified volcanic lake (Lac Pavin, France). *Geo. Cosmo. Acta* **63**:3357-3372.
- **Alexander, M.** 1999. *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press, New York.
- **Allers, T., and M. Mevarech.** 2005. Archaeal genetics-The Third way. *Genetics* **6**:58-73.
- **Alvenerie, J., B. Dégot, P. Lévêque, and M. Vigneaux.** 1966. Activité en tritium et caractéristiques chimiques des eaux du Lac Pavin. *C. R. Acad. Sci.* **262** :846-849.
- **Amann, R.** 2000. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst. Appl. Microbiol.* **23** :1-8.
- **Amann, R., L. Krumholz, D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
- **Amann, R. I., W. Ludwig, K-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb. Rev.* **59**:143-169.
- **Amblard, C., and F. Restituito.** 1983. Observations complémentaires en faveur de l'origine biogénique de la couche à hydrogène sulfuré d'un lac de moyenne montagne (Lac Pavin, France). *C. R. Acad. Sc.* **296**:1787-1790.
- **Amblard, C., J. C. Boisson, G. Bourdier, D. Fontvieille, X. Gayte, T. Sime- Ngando.** 1998. Microbial ecology in aquatic systems: a review from viruses to protozoa. *Rev. Sci. Eau.* 145-162.
- **Anbar, A. D., and A. H. Knoll.** 2002. Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge? *Science* **297**:1137-1142.
- **Anders, H. J., A. Kaetzke, P. Kampf, W. Ludwig, G. Fuchs.** 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the *beta* subclass of the *proteobacteria*. *Int. Syst. Bacteriol.* **45**:327-333.
- **Anderson, R. T., C. V. Rooney-Varga, C. V. Gaw, and D. R. Lovley.** 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III)-reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1222-1229.
- **Anderson, R. T., and D. R. Lovley.** 2000. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **34** :2261-2266.
- **Annweiler, E., A. Materna, M. Safinowski, A. Kappler, H.H. Richnow.** 2000. Anaerobic degradation of 2-methylnaphtalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5329-5333.
- **Arp, D. J., L. A. Sayavedra-Soto, N. G. Hommes.** 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **178**:250-255.
- **Ashkin, A., J. Dziedzic, Y. Yamane.** 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infra-red beams. *Nature* **330**:769-771.

Assayag, N. 2003. Traçages isotopiques du carbone et de l'oxygène dans le lac Pavin. Rapport de DEA, Paris XI.

Auburger, G., and J. Winter. 1995. Isolation and physiological characterization of *Syntrophus buswellii* strain GA from a syntrophic benzoate-degrading, strictly anaerobic coculture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44:241-248.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. A. Sideman, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. Section 24. (ed) John Wiley and sons. New York.

Avaniss-Aghajani, E., K. Jones, A. Holtzmann, T. Aronson, N. Glover, M. Boian, et al. 1996. Molecular technique for rapid identification of Mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 34:98-102.

Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 10:257-263.

Azam, F., and J. W. Ammerman. 1984. Cycling of organic matter by bacterioplankton in pelagic marine ecosystems: microenvironmental considerations. In: Fasham, M. J. R. (ed.), Flow of energy and materials in marine ecosystems. Plenum, New York, p. 345-360.



B

Balashova, V. V. 1985. The use of molecular sulfur to oxidize H₂ by the facultative anaerobe *Pseudomonas*. Microbiology 54:324-326.

Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43:260-296.

Balkwill, D. L., F. R. Leach, J. T. Wilson, J. F. McNabb, and D. C. White. 1988. Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate and direct counts in subsurface aquifer sediments. Microb. Ecol. 16:73-84.

Ball, H. A., H. A. Johnson, M. Reinhard, and A. M. Spormann. 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by

a denitrifying bacterium, strain EB1. J. Bacteriol. 178:5755-5761.

Barker, H. A. 1940. Studies upon the methane fermentation. IV: The isolation and culture of *Methanobacterium omelianskii*. Ant. v. Leeuwenhoek. 6:201-220.

Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jefferies, N. R. Pace. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1609-1613

Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. R. Palmer, N. R. Pace. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9188-9193.

Barns, S.M., S. L. Takala, C. R. Kuske. 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 65:1731-1737.

Barton, L. L., and F. A. Tomei. 1995. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: Sulfate-reducing Bacteria (Barton, L. L. Ed.) pp:1-32. Plenum Press, New York.

Bauld, J., and J. T. Staley. 1976. *Planctomyces maris* sp. nov.: a marine isolate of the *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria. J. Gen. Microbiol. 97:45-55.

Baxter, M., and J. M. Sieburth. 1984. Metabolic and ultrastructural response to glucose of two eutrophic bacteria isolated from seawater at different enriching concentrations. Appl. Environ. Microbiol. 47 :31-38.

Beijerinck, M. W. 1913. De infusies en de ontdekking der bacteriën. In Jaarboek van de Koninklijke Akademie v Wetenschappen, Müller, Amsterdam.

Bejá, O., M. T. Marcelino, E. V. Koonin, L. Aravind, A. Hadd, L. P. Nguyen, R. Villacorta, M. Amjadi, C. Garrigues, S. B. Jovanovich, R. A. Feldman, and E. F. DeLong. 2000. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. Environ. Microbiol. 2 :516-529.

Béj, O., E. V. Koonin, L. Aravind, L. T. Taylor, H. Seitz, J. L. Stein, D. C. Bensen, R. A. Feldman, R. V. Swanson, and E. F. DeLong. 2002. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single

population and in two different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:335-345.

■ **Beliaev, A. S., and D. A. Saffarini.** 1998. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J. Bacteriol.* **180**:6292-6297.

■ **Bell, S. D., S. P. Jackson.** 1998. Transcription and translation in *Archaea*: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol.* **6**:222-228.

■ **Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, M. Reinhard.** 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1188-1196.

■ **Beller, H. R., and A. M. Spormann.** 1997. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3729-3731.

■ **Benz, M., B. Schink, and A. Brune.** 1998. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4507-4512.

■ **Benz, M., A. Brune, and B. Schink.** 1998. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **169**:159-165.

■ **Bhatia, U., K. Robison, and W. Gilbert.** 1997. Dealing with database explosion: a cautionary note. *Science* **276**:1724-1725.

■ **Biegert, T., U. Altmann, C. Eckerskorn, and G. Fuchs.** 1995. Purification and properties of benzyl alcohol dehydrogenase from a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **163**:418-423.

■ **Bintrim, S. B., T. J. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts, R. M. Goodman.** 1997. Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:277-282.

■ **Bisaillon, J. G., F. Lepine, R. Beaudet, and M. Sylvestre.** 1993. Potential for carboxylation-dehydroxylation of phenolic compounds by a methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.* **39**:642-648.

■ **Bjorkholm, B., et al.** 2001. Comparison of genetic divergence and fitness

between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**:7832-7838.

■ **Blaut M.** 1994. Metabolism of methanogens. *Anton Leeuwenhoek* **66**:187-208.

■ **Boetius, A., K. Ravensschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gleseke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte, O. Pfannkuche.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature.* **407**:623-626.

■ **Boone, D. R., W. B. Whitman, and P. Rouvière.** 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In Ferry J. G. (ed.), *Methanogenesis*, pp. 35-80. Chapman and Hall Co., New York.

■ **Boone, D. R., Y. Liu, Z-J. Zhao, D. L. Balkwill, G. T. Drake, T. O. Stevens, and H. C. Aldrich.** 1995. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:441-448.

■ **Boone, P. I., P. Virtue, P. D. Nichols.** 1996. Microbial consortia in wetland sediments: a biomarker analysis of the effect of hydrological regime, vegetation and season on benthic microbes. *Mar. Freshwater. Res.* **47**:27-41.

■ **Boone, D. R., R. W. Castenholz, G. M. Garrity, eds.** 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. New York: Springer.

■ **Boopathy, R., J. Manning, and C. F. Kulpa.** 1997. Optimization of environmental factors for the biological treatment of trinitrotoluene-contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**:94-98.

■ **Borneman, J., E. W. Triplett.** 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2647-2653.

■ **Boschker, H. T. S., S. C. Nold, P. Wellsbury, D. Bos, W. De Graaf, R. Pel, R. J. Parkes, T. E. Capenberg.** 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. *Nature.* **392**:801-805.

■ **Bossert, I. D., G. Whited, D. T. Gibson, and L. Y. Young.** 1989. Anaerobic oxidation of p-cresol mediated by a partially

purified methylhydroxylase from a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **171**:2956-2962.

■ **Bothe, H., G. Jost, M. Schlöter, B. B. Ward, K-P. Witzel.** 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:673-690.

■ **Bouchard, B., R. Beaudet, R. Villemur, G. Mc-Sween, F. Lepine, J. G. Bisaillon.** 1996. Isolation and characterization of *Desulfotobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Bacteriol.* **46**:1010-1015.

■ **Bouchet, C.** 1987. Hydrogéologie en milieu volcanique. Le Bassin de la Veyre. Thèse Université d'Avignon, 360pp.

■ **Braker, G., A. Fesefeldt, and K-P. Witzel.** 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3769-3775.

■ **Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A. H. Devol, and J. M. Tiedje.** 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2096-2104.

■ **Brauman, A., J. A. Muller, J. L. Garcia, A. Brune, and B. Schink.** 1998. Fermentative degradation of 3-hydroxybenzoate in pure culture by a novel strictly anaerobic bacterium, *Sporomaculum hydroxybenzoicum* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:215-221.

■ **Braun, M., F. Mayer, and S. Gottschalk.** 1981. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch. Microbiol.* **128**:288-293.

■ **Brock, T. D., and J. Gustafson.** 1976. Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:567-571.

■ **Brock, T.** 1987. The study of microorganisms in situ: progress and problems. In *Ecology of microbial communities*. Edited by Fletcher M., Gray T. R. G., and J. G. Jones. Cambridge University Press; 1987.

■ **Brock, T.** 1989. Evolutionary relationships of the autotrophic bacteria. In: H. G. Schlegel and B. Bowien (Eds.). *Autotrophic bacteria*. Science Tech. Publishers Madison, WI, pp: 499-512.

■ **Broda, E.** 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* **17**:491-493.

■ **Bromfield, S. M.** 1954. The reduction of iron oxide by bacteria. *J. Soil. Sci.* **5**:129-139.

■ **Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. R. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4801-4805.

■ **Brown, J. W., and W. F. Doolittle.** 1995. Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:2441-2445.

■ **Brown, V. I., and E. J. L. Lowbury.** 1996. Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* **18**:752-756.

■ **Brown, J. R., W. F. Doolittle.** 1997. *Archaea* and the prokaryote to eukaryote transition. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **61**:456-502.

■ **Bruce, K. D.** 1997. Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4914-4919.

■ **Bruce, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike, D. A. Ritchie.** 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3413-3416.

■ **Bruns, A., H. Cypionka, and J. Overmann.** 2002. Cyclic AMP and Acyl Homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3978-3987.

■ **Bryant, M. P., E. A. Wolin, M. J. Wolin, and R. S. Wolfe.** 1967. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **59**:20-31.

■ Buckley, D. H., T. M. Schmidt. 2002. Exploring the diversity of soil-a microbial rain forest. Biodiversity of Microbial Life: Foundations of Earth's Biosphere. New York: Wiley-Liss. pp. 183-208.

■ Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. Fitzgerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne *et al.* 1996. Complete genome sequence of the metanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschi*. Science. **273**:1058-1073.

■ Burggraf, S., H. W. Jannasch, B. Nicolaus, and K. O. Stetter. 1990. *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. Syst. Appl. Microbiol. **13**:24-28.

■ Button, D. K., F. Schut, P. Quang, R. Martin, and B. R. Robertson. 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1707-1713.

■ Button, D. K., B. R. Robertson, P. W. Lepp, and T. M. Schmidt. 1998. A small, dilute cytoplasm, high affinity, novel bacterium isolated by extinction culture and having kinetic constants compatible with growth at ambient concentrations of dissolved nutrients in seawater. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4467-4476.



C

■ Caccavo, F., Jr., D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz, and M. J. McInerney. 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate oxidizing Fe(III) dissimilatory metal-reducing microorganism. Appl. Environ. Microbiol. **60**:3752-3759.

■ Caccavo Jr., F. P. C. Schamberger, K. Keiding, and P. H. Nielsen. 1997. Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* to amorphous Fe(III) oxide. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3837-3843.

■ Cairns-Smith, A. G., A. J. Hall, and M. J. Russell. 1992. Mineral theories of the origin of life and an iron sulfide example. Orig. Life Evol. Biosphere. **22**:161-180.

■ Camus, G., G. Michard, P. Olive, P. Boivin, P. Desgranges, D. Jézéquel, M. Meybeck, J. C. Peyrus, J. M. Vinson, E.

Viollier, and J. Kornprobst. 1993. Risque d'éruption gazeuse carbonique en Auvergne. Bull. Sci. Geol. Fr. **164**:767-781.

■ Cappenberg, T. E. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a freshwater lake. I-Field observation. Antonie van Leeuwenhoek. **40**:285-295.

■ Cappenberg, T. E., and R. A. Prins. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. III-Experiments with ¹⁴C-labelled substrates. Antonie van Leeuwenhoek. **40**:457-469.

■ Carman, K. R. 1993. Microautoradiographic detection of microbial activity. In: Handbook of Methods in Aquatic Microbiology (Kemp, P., et al. Eds), pp. 397-404. Lewis Publishers, Boca raton, FL.

■ Castro, H. F., N. H. Williams, A. Ogram. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. **31**:1-9.

■ Cervantes, F. J., S. van der Velde, G. Lettinga, and J. A. Field. 2000. Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. Biodegradation **11**:313-321.

■ Champiat, D. 1976. Application du dosage des adénosines 5-phosphate à l'étude de la microflore du lac Pavin. Thèse de 3^{ème} cycle, Clermont-Ferrand.

■ Chen, W., K. Ohmiya, S. Shimizu, and H. Kawakami. 1988. Isolation and characterization of an anaerobic dehydrodivanillin-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1254-1257.

■ Chen, A., and C. D. Poulter. 1993. Purification and characterization of farnesyl diphosphate/ geranylgeranyl diphosphate synthase. A thermostable bifunctional enzyme from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. J. Biol. Chem. **268**:11002-11007.

■ Chen, A., P. A. Kroon, and C; D. Poulter. 1994. Isoprenyl diphosphate synthases : Protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. Protein Sci. **3**:600-607.

■ Chen, C. I., and R. T. Taylor. 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **48**:121-128.

- Childers, S. E., S. Ciufo, and D. R. Lovley. 2002. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* **416**:767-769.
- Chin, K.-J., W. Liesack, P. H. Janssen. 2001. *Opitutus terrae* gen. nov, sp. nov, to accomodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1965-1968.
- Clayton, R. K., and W. R. Sistrom. 1978. *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York.
- Clayton, R. A., G. Sutton, P. S. Hinkle Jr., C. Bult, and C. Fields. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:595-599.
- Clement, B. G., L. E. Kelh, K. L. DeBord, and C. L. Kitts. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods* **31**:135-142.
- Coates, J. D., D. J. Lonergan, and D.R. Lovley. 1995. *Desulfomonas palmitatis* sp. nov., a long chain fatty acid oxidizing Fe(II) reducer from marine sediments. *Arch. Microbiol.* **164**:406-413.
- Coates, J. D., R. T. Anderson, and D. R. Lovley. 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1099-1101.
- Coates, J. D., U. Michaelidou, R. A. Bruce, S. M. O'Connor, J. N. Crespi, L. A. Achenbach. 1999. Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** :5234-5241.
- Coates, J. D., R. Chakraborty, J. G. Lack, S. M. O'Connor, and K. A. Cole, *et al.* 2001. Anaerobic benzene oxidation coupled to tnitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* **411**:1039-1043.
- Coates, J. D., K. A. Cole, R. Chakraborty, S. M. O'Connor, L. A. Achenbach. 2002. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2445-2452.
- Cohan, F. M. 2001. Bacterial species and speciation. *Syst. Biol.* **50**:513-524.
- Cole, S. T., and I. S. Giron. 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:139-160.
- Coleman, M. L., D. B. hedrick, D. R. Lovley, D. C. White, and K. Pye. 1993. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature (London)* **361**:436-438.
- Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. E. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-826.
- Collins, G., A. Woods, S. McHugh, M. W. Carton, V. O'Flaherty. 2003. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**:159-170.
- Connon, S. A., and S. J. Giovannoni. 2002. High-Throughput methods for culturing microorganisms in very-low nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** :3878-3885.
- Conrad, R., T. J. Phelps, and J. G. Zeikus. 1985. Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:595-601.
- Cord-Ruwisch, R., D. R. Lovley, and B. Schink. 1998. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2232-2236.
- Cornell, R. M., and U. Schwertmann. 1996. *The iron oxides-Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH, Weinheim.
- Coshigano, P. W., M. M. haggblom, and L. Y. Young. 1994. Metabolism of both 4-chlorobenzoate and toluene under denitrifying conditions by a constructed bacterial strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:989-995.
- Courtois, S., C. M. Cappelano, M. Ball, F. X. Francou, P. Normand, *et al.* 2003. Recombinant environmental libraries provide

access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:49-55.

■ **Cowan, D. A., et al.** 2004. Metagenomics, gene discovery, and the ideal biocatalyst. *Biochem. Soc. Trans.* **32**:298-302.

■ **Cummings, D. E., F. Caccavo Jr., S. Spring, and R. F. Rosenzweig.** 1999. *Ferribacter limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe (III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.* **171**:183-188.

■ **Curtis, T. P., W. T. Sloan, J. W. Scannell.** 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:10494-10499.

■ **Curtis, T. P., and W. T. Sloan.** 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:221-226.



D

■ **Dalevi, D., P. Hugenholtz, L. L. Blackall.** 2001. A multiple-outgroup approach to resolving division-level phylogenetic relationships using 16S rDNA data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:385-391.

■ **Dalsgaard, T., B. Thamdrup.** 2003. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3802-3808.

■ **Danson, M. J., R. Eiseenthal, S. Hall, S. R. Kessel, and D. L. Williams.** 1984. Dihydrolipoamide deshydrogenase from halophilic *Archaeobacteria*. *Biochem. J.* **218**:811-818.

■ **Danson, M. J.** 1989. Central metabolism of the Archaeobacteria : An overview. *Can. J. Microbiol.* **35**:58-64.

■ **Danson, M. J.** 1993. Central metabolism of the Archaea, P. 1-24. In M. Kates, D. J. Kushner, and A. T. Matheson (ed.), *The biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

■ **Dautray, R.** 1991. Accessible via le site: www.ens-lyon.fr

■ **De Castro, A. F., and L. Ehrlich.** 1970. Reduction of iron oxide minerals by a marine *Bacillus*. *Ant. V. Leeuwenhoek.* **36**:317-327.

■ **De Duve, C.** 1995. *Vital Dust*, Basic Books New York, NY, pp. 362.

■ **DeBruyn, J. C., F. C. Boogerd, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1990. Floating filters, a novel technique for isolation and enumeration of fastidious, acidophilic, autotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** :2891-2894.

■ **Delebecque, A.** 1898. *Les lacs français*, vol. A, Chamerot et Renouard Ed.), Paris.

■ **DeLong, E. F.** 1992. *Archaea* in coastal environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:5685-5689.

■ **DeLong, E. F.** 1998. Everything in moderation: *Archaea* as 'non-extremophiles'. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **8**:649-654.

■ **DeLong, E. F., D. G. Franks, A. L. Alldredge.** 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. Free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **38**:924-934.

■ **DeLong E. F., K. Y. Wu, B. B. Prezelin, R. V. M. Jovine.** 1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371** :695-697.

■ **DeLong, E. F., L. T. Taylor, T. L. Marsh, C. M. Preston.** 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic *Archaea* and *Bacteria* by using polyribonucleotide probes and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5554-5563.

■ **DeNiro, M., S. Epstein.** 1977. Mechanism of carbone isotope fractionation associated with lipid synthetis. *Science.* **197**:261-263.

■ **Deppenmeier, U., V. Müller, and G. Gottschalk.** 1996. Pathways of energy conservation in methanogenic *Archaea*. *Arch. Microbiol.* **165**:149-163.

■ **Derakshani, M., T. Lukow, W. Liesack.** 2001. Novel bacterial lineages at the sub-division level as detected by signature nucleotide targeted recovery 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Environ. Microbiol.* **67**:623-631.

■ **DeRisi, J., et al.** 1996. Use of a cDNA microarray to analyse patterns in human cancer. *Nature Genet.* **14**:457-460.

■ **Devereux R., M. D Kane., J. Winfrey, D.A. Stahl.** 1992. Genus and group specific hybridisation probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 601-609.

■ **Diaz-Torres, M. L., R. McNab, D. A. Spratt, A. Villedieu, N. Hunt, M. Wilson, and P. Mullany.** 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1430-1432.

■ **Dobbin, P. S., L. H. Warren, N. J. Cook, A. G. McEwan, A. K. Powell, and D. J. Richardson.** 1996. Dissimilatory iron (III) reduction by *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **142**:765-774.

■ **Dobzhansky, T.** 1937. Genetics and the origin of species, Columbia University Press, New York, USA.

■ **Dojka, M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack, N. R. Pace.** 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3869-3877.

■ **Dolfing, J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R. P. Schwarzenbach.** 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **159**:109-113.

■ **Drake, H. L., K. Küsel, and C. Matthies.** 2002. Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. *Ant. V. Leeuwenhoek.* **81**:203-213.

■ **Drake, H., K. Küsel, and C. Matthies** 2006. Acetogenic prokaryotes. Accessible *via* le site "The Prokaryotes": <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/344/COMPLETE.htm>

■ **Drzyzga, O., J. Kuver, and K. H. Blotevogel.** 1993. Complete oxidation of benzoate and 4-hydroxybenzoate by a new sulfate-reducing bacterium resembling *Desulfoarculus*. *Arch. Microbiol.* **159**:109-113.

■ **Dunbar, J., S. M. Barns, L. O. Ticknor, C. R. Kuske.** 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3035-3045.

E

■ **Edwards E. A., and D. Grbic-Galic.** 1994. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:313-322.

■ **Egland, P. G., J. Gibson, and C. S. Harwood.** 2001. reductive, coenzyme A-mediated pathway for 3-Chlorobenzoate degradation in the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1396-1399.

■ **Egli, K., U. Franger, P. J. J. Alvarez, H. Siegrist, J. R. Vandermeer, A. J. B. Zehnder.** 2001. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contractor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* **175**:198-207.

■ **Ehrenreich, A., and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** :4517-4526.

■ **Eickhoff, H., et al.** 2002. Protein array technology: the tool to bridge genomics and proteomics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **77**:103-112.

■ **Elder, D. J., P. Morgan, and D. J. Kelly.** 1992. Anaerobic degradation of trans-cinnamate and omega-phenylalkane carboxylic acids by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*: Evidence for a beta-oxidation mechanism. *Arch. Microbiol.* **157**:148-154.

■ **Elrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig, E. Bock.** 1995. A new obligately chemolitho-autotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* **164**:16-23.

■ **Elshahed, M. S., V. K. Bhupathiraju, N. Q. Wofford, M. A. Nanny, and M. J. McInerney.** 2001. Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by "*Syntrophus aciditrophicus*" strain SB in syntrophic association with H(2)-using microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:172_-1738.

■ **Engbreton, J. J., and C. L. Moyer.** 2003. Fidelity of select restriction endonucleases

in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4823-4829.

F

■ **Fauque, G. D.** 1995. Ecology of sulfate-reducing bacteria. In: *Sulfate-reducing Bacteria* (Barton, L. L. Ed.), pp:217-241. Plenum Press, New York.

■ **Felsenstein, J.** 1973. Maximum-likelihood and minimum steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* **22**:240-249.

■ **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.* **30**:783-791.

■ **Felske, A., A. D. L. Akkermans, and W. M. De Vos.** 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4581-4587.

■ **Fennell, D. E., A. B. Carrol, J. M. Gossett, S. H. Zinder.** 2001. *Environ. Sci. Technol.* **35**:1830.

■ **Ferguson, S. J.** 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**:182-193.

■ **Fernandez, A. S., S. A. Hashsham, S. L. Dollhopf, L. Raskin, O. Glagoleva, F. B. Dazzo, R. F. Hickey, C. S. Criddle, and J. M. Tiedje.** 2000. Flexible community structure correlate with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4058-4067.

■ **Ferris, M. J., A. L. Ruff-Roberts, E. D. Kopyczynski, M. M. Bateson, and D. M. Ward.** 1996. Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1045-1050.

■ **Ferry, J. G.** 1992. Methane from acetate. *J. Bacteriol.* **174**:5489-5495.

■ **Field, K. G., D. Gordon, T. Wright, M. Rappé, E. Urback, K. Vergin, and S. J. Giovanni.** 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from

marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:63-70.

■ **Findlay, R. H., M. B. Trexler, J. B. Guckert, D. C. White.** 1990. Laboratory study of disturbance in marine sediments: response of a microbial community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **62**:121-133.

■ **Finstler, K., F. Bak, and N. Pfennig.** 1994. *Desulfuromonas acetexigenes* sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing *enbacterium* from anoxic freshwater sediments. *Arch. Microbiol.* **161**:328-332.

■ **Fisher, F., R. lieske, and K. Winzer.** 1932. Biologische Gasreaktionen. II: Über die bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure mit Wasserstoff zu Methan. *Biochem. Zeitschr.* **245**:2-12.

■ **Fitch, W.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**:406-416.

■ **Forterre, P., C. Brochier, and H. Philippe.** 2002. Evolution of the *Archaea*. *Theor. Popul. Biol.* **61**:409-422.

■ **Fortier, D.** 1993. Characteristics of lacustrine diagenetic oxihydroxides. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**:4391-4404.

■ **Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gilson, J. Maniloff, et al.** 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* **209**:457-463.

■ **Franzmann, P. D., N. Springer, W. Ludwig, E. Conway de Macario, and M. Rohde.** 1992. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Syst. Appl. Environ. Microbiol.* **15**:573-581.

■ **Franzmann, P. D., Y. Liu, D. L. Balkwill, H. C. Aldrich, E. Conway de Macario, and D.R. Boone.** 1997. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1068-1072.

■ **Fredrickson, J. K., and Y. A. Gorby.** 1996. Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* **7**:287-294.

■ **Freeman, K. H., J. M. Hayes, J. M. Trendel, P. Albrecht.** 1990. Evidence from carbon isotope measurements for diverse origins

of sedimentary hydrocarbons. *Nature*. **392**:801-805.

■ **Frohlich, J., and H. König.** 2000. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:567-572.

■ **Frontier, S., and D. Pichod-Viale.** 1998. *Ecosystème: Structure et Fonctionnement. Evolution*, 2^{ème} édition, Dunod, Paris.

■ **Fuhrman, J. A., D. E. Comeau, A. Hagstrom, A. M. Chan.** 1988. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1426-1429.

■ **Fuhrman, J. A., K. McCallum, A. A. Davis.** 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*. **356**:148-149.

■ **Fuhrman, J. A., K. McCallum, A. A. Davis.** 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1294-1302.

■ **Fuhrman, J. A., A. A. Davis.** 1997. Widespread archaea and novel Bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **150**:275-285.

■ **Fuhrman, J. A., and C. C. Ouverney.** 1998. Marine microbial diversity studied via 16S rRNA sequences: coastal cloning results and counting of native archaea with fluorescent single cell probes. *Aquat. Ecol.* **32**:3-15.

■ **Fujii, T., H. Sugino, J. D. Rouse, K. Furukawa.** 2002. Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a non-woven biomass carrier. *J. Biosci. Bioeng.* **94**:412-418.

■

G

■ **Gallus, C., and B. Schink.** 1994. Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. *Microbiology* **140**:409-416.

■ **Gallus, C., and B. Schink.** 1998. Anaerobic degradation of alpha-resorcyate by *Thauera aromatica* strain AR-1 proceeds via oxidation and decarboxylation to hydroxyhydroquinone. *Arch. Microbiol.* **169**:333-338.

■ **Galtier, N., N. Tourasse, M. Gouy.** 1999. A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms. *Science*. **5399**:220-221.

■ **Galushko, A., D. Minz, B. Schink, and F. Widdel.** 1999. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **1**:415-420.

■ **Galvez, A., M. Maqueda, M. Martinez-bueno, E. Valdivia.** 1998. Publication rates reveal trends in microbiological research. *ASM News* **64**:269-275.

■ **Gambacorta, A., A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama, and M. De Rosa.** 1993. Unique features of lipids of *Archaea*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:18-27.

■ **Garcia, J-L., B. K. C. Patel, and B. Ollivier.** 2000. Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* **6**:205-226.

■ **Garrity, G. M., J. G. Holt.** 2001. The road map of the manual. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. new York: Springer, **1**:119-166.

■ **Gaspard, S., F. Vasquez, and C. Holliger.** 1998. Localization and solubilization of the iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**:3188-3194.

■ **Genthner, B. R.** 1999. Preliminary characterization of four 2-chlorobenzoate-degrading anaerobic bacterial consortia. *Biodegradation* **10**:27-33.

■ **Gibson, J., and C. S. Harwood.** 2002. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:345-369.

■ **Gibson, J., W. Ludwig, E. Staackebrandt, C. R. Woese.** 1985. The phylogeny of the green photosynthetic bacteria: absence of a close relationship between *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**:152-156.

■ **Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen, N. R. Pace.** 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**:720-726.

■ **Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, and K. G. Field.** 1990. Genetic

diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. **345**:60-63.

■ **Giovannoni, S. J., M. S. Rappé, K. L. Vergin, N. L. Adair.** 1996. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the Green Non-Sulfur bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7979-7984.

■ **Giovannoni, S. J., M. Rappé.** 2000. Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In *Microbial Ecology of the Oceans*, ed. D. L. Kirchman, New York: Wiley pp. 47-84.

■ **Girguis, P. R., V. J. Orphan, S. J. Hallam, E. F. Delong.** 2003. Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic *Archaea* in a continuous-flow bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5472-5482.

■ **Glass, G. V.** 1976. Primary, secondary and meta-analysis of research. *Educ. Res.* **5**:3-8.

■ **Glöckner, F. O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius K., and K-H. Schleifer.** 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **19**:403-406.

■ **Godon, J. J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, R. Moletta.** 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2802-2813.

■ **Gorby, Y. A., and D. R. Lovley.** 1991. Electron transport in the dissimilatory iron reducer, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* **199**:867-870.

■ **Gordon, D. A., and S. J. Giovannoni.** 1996. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1171-1177.

■ **Gorny, N., and B. Schink.** 1994. Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. strain cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3396-3400.

■ **Gottschalk, G., and M. Braun.** 1981. Revival of the name *Clostridium aceticum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:476.

■ **Grbic-Galic, D., N. Churchman-Eisel, and I. Mrakovic.** 1990. Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:247-260.

■ **Green, C. T., K. M. Scow.** 2000. Analysis of phospholipid fatty acids (PFLA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeol. J.* **8**:126-141.

■ **Grimes, D. J., A. L. Mills, and K. H. Nealson.** 2000. The importance of viable but nonculturable bacteria in biogeochemistry. In *Non culturable microorganisms in the environment*, R. R. Colwell and D. J. Grimes, ASM Press, Washington D. C.

■ **Gunner, H. B., and M. Alexander.** 1964. Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. *J. Bacteriol.* **87**:1309-1316.

H

■ **Hafenbradl, D., M. Keller, R. Dirmeier, R. Rachel, P. Rosnagel, et al.** 1996. *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **166**:308-314.

■ **Häggblom, M. M., M. D. Rivera, and L. Y. Young.** 1993. Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1162-1167.

■ **Häggblom, M. M., M. D. Rivera, and L. Y. Young.** 1996. Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids coupled to denitrification observed in a variety of sediment and soil samples. *FEMS microbiol. Lett.* **144**:213-219.

■ **Häggblom, M. M., and L. Y. Young.** 1999. Anaerobic degradation of 3-halobenzoates by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **171**:230-236.

■ **Hallam, J. H., P. R. Girguis, C. M. Preston, P. M. Richardson, E. F. DeLong.** 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing *Archaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5483-5491.

■ **Hallam, S. J., et al.** 2004. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with

environmental genomics. *Science*. **305**:1457-1462.

■ **Hammann, R., and J. C. G. Ottow.** 1974. Reductive dissolution of Fe_2O_3 by saccharolytic *Clostridia* and *Bacillus Polymyxa* under anaerobic conditions. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **137**:108-115.

■ **Handelsman, J.** 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:669-685.

■ **Hansen T. A.** 1994. Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 165-185.

■ **Hanson, J. R., J. L. Macalady, D. Harris, K. M. Scow.** 1999. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5403-5408.

■ **Harms, G., K. Zengler, R. Rabus, F. Aeckersberg, D. Minz, R. Rossello-Mora, and F. Widdel.** 1999. Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:999-1004.

■ **Harms, G., R. Rabus, and F. Widdel.** 1999. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **172**:303-312.

■ **Harris, J. K., T. K. Scott, and N. R. Pace.** 2004. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:845-849.

■ **Harwood, C. S., and J. Gibson.** 1988. Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:712-717.

■ **Harwood, C. S., J. Gibson.** 1997. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J. Bacteriol.* **179**:301-309.

■ **Harwood, C. S., G. Burchhardt, H. Herrmann, G. Fuchs.** 1999. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 439-458.

■ **Hastings D., S. Emerson.** 1988. Sulfate reduction in the presence of low oxygen levels in the water column of the Cariaco Trench. *Limnol. Oceanogr.* **33**:391-396.

■ **Hayes, J. M.** 1993. Factors controlling ^{13}C contents of sedimentary organic compounds: principles and evidence. *Mar. Geol.* **113**:111-125.

■ **Head, I. M., J. R. Saunders, R. W. Pickup.** 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35**:1-21.

■ **Healy, J. B., and L. Y. Young.** 1978. Catechol and phenol degradation by a methanogenic population of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:216-218.

■ **Hedlund, B. P., J. J. Gosink, J. T. Staley.** 1997. *Verrucomicrobia* div. nov., a new division of *Bacteria* containing three new species of *Prostheco bacter*. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**:29-38.

■ **Hedlund, B. P., J. J. Gosink, J. T. Staley.** 1996. Phylogeny of *Prostheco bacter*, the fusiform *caulobacters*: members of a recently discovered division of the *Bacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:960-966.

■ **Heider, J., and G. Fuchs.** 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**:577-599.

■ **Heider, J. A., A. M. Spormann, H. R. Beller, F. Widdel.** 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:459-473.

■ **Heijman, C. G., C. Holliger, M. A. Glaus, R. P. Schwazzenbach, and J. Zeyer.** 1993. Abiotic reduction of 4-chloronitrobenzene to 4-chloroaniline in a dissimilatory iron-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:4350-4353.

■ **Heising, S., A. Brune, and B. Schink.** 1991. Anaerobic degradation of 3-hydroxybenzoate by a newly isolated nitrate-reducing bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:267-272.

■ **Heising, S., and B. Schink.** 1998. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodospirillum rubrum* strain. *Microbiology* **144**:2263-2269.

■ **Heising, S., L. Richter, W. Ludwig, and B. Schink.** 1999. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a "*Geospirillum*" sp. strain. *Arch. Microbiol.* **172**:116-124.

- Henry, E. A., *et al.* 1994. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfobacterium yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov. : its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Arch. Microbiol.* **161**:62-69.
- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wagner, *et al.* 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Environ. Microbiol.* **68**:4431-4440.
- Hernandez, M. E, and D. K. Newman. 2001. Extracellular electron transfer. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1562-1571.
- Hershberger, K. L., S. M. Barns, A. L. Reysenbach, S. C. Dawson, N. R. Pace. 1996. *Crenarchaeota* in low-temperature terrestrial environments. *Nature.* **384**:420-aaa.
- Hess, A., B. Zarda, D. Haan, A. Häner, D. Stax, and J. Zeyer. 1997. *In situ* analysis of denitrifying toluene and m-xylene degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2136-2141.
- Heuer, H., M. Kresk, P. Baker, K. Smalla, and E. M. H. Wellington. 1997. Analysis of *actinomyce* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3233-3241.
- Heywood, V. D. 1995. Global biodiversity assessment. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hinrichs, K. U., J. M. Hayes, S. P. Sylva, P. G. Brewer, E. F. DeLong. 1999. Methane-consuming *Archaeobacteria* in marine sediments. *Nature* **398**:802-805.
- Hippe, H. 2000. *Leptospirum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva *et al.* 1992). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50** :501-503.
- Hobbie, J. E., and Williams, P. J le B. (eds.). 1984. Heterotrophic activity in the sea: Plenum Press, New York.
- Hofstetter, T. B., C. G. Heijman, S. B. Haderlein, C. Holliger, and R. P. Schwarzenbach. 1999. Complete reduction of TNT and other (poly) nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions. *Environ. Sci. Technol.* **33**:1479-1487.
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm, J. M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:703-711.
- Hollibaugh, J. T. 1994. Relationship between thymidine metabolism, bacterioplankton community metabolic capabilities and source of organic matter used for growth. *Microb. Ecol.* **28**:117-131.
- Hollibaugh, J. T., P. S. Wong, N. Bano, S. K. Pak, E. M. Prager, and C. Orrego. 2001. Stratification of microbial assemblages in Mono Lake, California, and response to a mixing event. *Hydrobiologia* **466**:45-60.
- Holliger, C., G. Wohlfarth, G. Diekert. 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:383-398.
- Holmes, A. J., N. A. Tujula, M. Holley, A. Contos, J. M. James, *et al.* 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ. Microbiol.* **3**:256-264.
- Hopper, D. J., I. D. Bossert, and M. E. Rhodes-Roberts. 1991. p-cresol methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of p-cresol. *J. Bacteriol.* **173**:1298-1301.
- Horz, H. P., J. H. Rootthauwe, T. Lukow, and W. Liesack. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products. *J. Microbiol. Methods.* **39**:197-204.
- Huber, R., T. Wilharm, D. Huber, A. Trincorne, S. Burggraf, *et al.* 1992. *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15** :340-351.
- Huber, R., H. Huber, K. O. Stetter. 2000a. Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:615-623.
- Huber, H., S. Buggraf, T. Mayer, I. Wyschkony, R. Rachel, K. O. Stetter. 2000b.

Ignicoccus gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautrophic *Archaea*, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:2093-2100.

■ **Huber, H. et al.** 2002. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63-67.

■ **Huelsenbeck, J., and D. Hillis.** 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Syst. Biol.* **42**:247-264.

■ **Huet, J., R. Schnabel, A. Sentenac, and W. Zilling.** 1983. *Archaeobacteria* and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J.* **2**:1291-1294.

■ **Hugenholtz, P.** 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic area. *Genome Biol.* **3**:1-8.

■ **Hugenholtz, P., and N. R. Pace.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**:190-197.

■ **Hugenholtz, P., B. M. Goebel, N. R. Pace.** 1998a. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765-4574.

■ **Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger, N. R. Pace.** 1998b. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**:366-376.

■ **Hugenholtz, P. C., G. W. Tyson, R. I. Webb, A. M. Wagner, L. L. Blackall.** 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:411-419.

■ **Humayoun, S. B., N. Bano, and J. T. Hollibaugh.** 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono lake, a meromictic soda lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030-1042.

■ **Hungate, R.E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In Norris J. R., J. C. Ryden, and E. W. Ribbons (eds.) *Methods in Microbiology* 3B, pp. 117-132. Academic Press, New York.

■ **Jacob, F.** 1976. « La logique du vivant. Une histoire de l'hérédité. Gallimard Eds., Paris.

J

■ **Jannasch, H. W., and G. E. Jones.** 1959. Bacterial populations in sewerage as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* **4**:128-139.

■ **Jaquet, J. M., G. Nembrini, J. Garcia, and J. P. Vernet.** 1982. The manganese cycle in Lac Léman. Switzerland: the role of manganic iron. *Hydrobiologia.* **91**:323-340.

■ **Jeanthon, C., S. L'Haridon, V. Cuff, A. Banta, A. L. Reysenbach, D. Prieur.** 2002. *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* sp. nov. a thermophilic chemolithoautrophic sulfate-reducing bacterium isolated from a deep sea hydrothermal vent at guaymas basin and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:765-772.

■ **Jeffrey, W. H., S. Nazaret, and T. Barkay.** 1996. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Applic.* **3**:186-194.

■ **Jenney, F. E., M. F. J. M. Verhagen, X. Cui, M. W. W. Adams.** 1999. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science.* **286**:308-309.

■ **John, H., M. Birnstiel, K. Jones.** 1969. RNA:DNA hybrids at the genetical level. *Nature* **223**:582-587.

■ **Jones, J. G., S. Gardener, and B. Simon.** 1983. Bacterial reduction of ferric iron in a stratified eutrophic lake. *J. Gen. Microbiol.* **129**:131-139.

■ **Jones, W. J., M. J. B. Paynter, and R. Gupta.** 1983. Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Arch. Microbiol.* **135**:91-97.

■ **Jones, J. G., W. Davison, and S. Gardener.** 1984. Iron reduction by bacteria: a range of organisms involved and metals reduced. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**:133-136.

■ **Jones, W. J., D. P. Nagle Jr., and W. B. Whitman.** 1987. Methanogens and the diversity of *Archaeobacteria*. *Microbiol. Rev.* **51**:135-177.

■ **Jorgensen, K. S.** 1989. Annual pattern of denitrification and nitrate ammonification in

estuarine sediment. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1841-1847.

■ **Jorgensen, B. B., M. F. Isaksen, and H. W. Jannasch.** 1992. Bacterial sulfate reduction above 100°C in the deep-sea hydrothermal vent sediments. Science **258**:1756-1757.

■ **Jukes, T., and C. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic press, New York, NY, pp. 21-31.

■ **Jurgens, G., K. Lindstrom, A. Saano.** 1997. A novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. Appl. Environ. Microbiol. **63** :803-805.

K

■ **Kabayashi, M., Y. Matsuo, A. Takimoto, S. Suzuki, F. Maruo, and H. Shoun.** 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. J. Biol. Chem. **271**:16263-16267.

■ **Kaeberlein, T. K. Lewis, S. S. Epstein.** 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. Science. **296** :1127-1129.

■ **Kahng, H. Y., J. J. Kukor, and K. H. Oh.** 2000. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. FEMS Microbiol. Lett. **190**. 215-221.

■ **Karlsson, J. L., B. E. Volcani, and H. A. Barker.** 1948. The nutritional requirements of *Clostridium aceticum*. J. Bacteriol. **56**:781-782.

■ **Kashefi, K., and D. R. Lovley.** 1999. Reduction of Fe(III) and toxic and radioactive metals by *Pyrobaculum* species. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 1050-1056.

■ **Kates, M.** 1993. Membrane lipids of *Archaea*, P. 261-295. In M. Kates, D. J. Kushner, and A. T. Matheson (ed.), The Biochemistry of *Archaea* (*Archaeobacteria*). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

■ **Kates, M., D. J. Kushner, and A. T. Matheson.** 1993. The biochemistry of *Archaea* (*Archaeobacteria*). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

■ **Kaufmann, F., and D. R. Lovley.** 2001. Isolation and characterization of a soluble NADPH-dependent Fe(III) reductase from *Geobacter sulfurreducens*. J. Bacteriol. **183**:4468-4476.

■ **Kazumi, J., M. M. Häggblom, and L. Y. Young.** 1995. Diversity of anaerobic microbial processes in chlorobenzoate degradation: nitrate, iron, sulfate and carbonate as electron acceptors. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**:929-936.

■ **Keeling, P. J., R. L. Charlebois, and W. F. Doolittle.** 1994. Archaeobacterial genomes: eubacterial form and eukaryotic content. Curr. Opin. Genet. Dev. **4**:816-822.

■ **Kengen, S. W. M., F. A. M. de Bok, N.-D. van Loo, C. Dijkema, A. J. M. Stams, and W. M. de Vos.** 1994. Evidence of the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. **269**:17537-17541.

■ **Khanna, P., B. Rajkumar, and N. Jothikumar.** 1992. Anoxygenic degradation of aromatic substances by *Rhodospseudomonas palustris*. Curr. Microbiol. **25**:63-67.

■ **Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. **16**:111-120.

■ **Kino, K., and S. Usami.** 1982. Biological reduction of ferric iron by iron-and sulfur-oxidizing bacteria. Agric. Biol. Chem. **46**:803-805.

■ **Kivisaar, M.** 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. Environ. Microbiol. **5**:814-827.

■ **Kleerebezem, R., L. W. Pol, and G. Lettinga.** 1999. Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds. Biodegradation **10**:63-73.

■ **Klenk, H. P., and W. F. Doolittle.** 1994. *Archaea* and eukaryotes versus *Bacteria*? Curr. Biol. **4**:920-922.

■ **Klug, M. J., and J. M. Tiedje.** 1993. Response of microbial communities to changing environmental conditions: chemical and physiological approaches. In: Trends in Microbial Ecology (Guerrero, R. And Pédrós-

Alió, C., Eds.), pp. 371-374. Spanish society for Microbiology. Barcelona.

■ **Knoblauch, C., K. Sahm, B. B. Jorgensen.** 1999. Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfobaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov., and *Desulfotalea arctica* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:1631-1643.

■ **Kobayashi, M., Y. Matsuo, A. Takimoto, S. Suzuki, F. Maruo, and H. Shoun.** 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. J. Biol. Chem. **271**:16263-16267.

■ **Koch, R.** 1884. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. **2**:1-88. English translation in Milestones in Microbiology (ed. T. D. Brock). 116-118 (Prentice Hall Inc., New Jersey, 1961).

■ **Koga, Y., M. Nishihara, H. Morii, and M. Akagawa-Matsushita.** 1993. Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. Microbiol. Rev. **57**:164-182.

■ **Koonin, E. V., A.R. Mushegian, M. Y. Galperin, D. R. Walker.** 1997. Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the *Archaea*. Mol. Microbiol. **25**:619-637.

■ **Kotelnikova, S., A. J. L. Macario, and K. Pedersen.** 1998. *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:357-367.

■ **Krieger, C. J., H. R. Beller, M. Reinhard, and M. M. Spormann.** 1999. Initial reactions in anaerobic oxidation of m-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. J. Bacteriol. **181**:6403-6410.

■ **Krüger, M., A. Meyerdierks, F. O. Glöckner, R. I. Amann, F. Widdel, et al.** 2003. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. Nature. **426**:878-881.

■ **Krumholz, L. R., R. Sharp, and S. S. Fishbain.** 1996. A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene

dehalogenation. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4108-4113.

■ **Krumholz L. R., J. Li, W. W. Clarkson, G. G. Wilber, and J. M. Suflita.** 1997. Transformations of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron-accepting conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **18**:161-169.

■ **Krumholz, L. R.** 1997. *Desulfomonas chloroethenica* sp. nov. Uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. Int. J. Syst. Bacteriol. **41**:1262-1263.

■ **Krumholz, L. R., S. H. Harris, S. T. Tay, and S. M. Suflita.** 1999. Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeum* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2300-2306.

■ **Kuever, J., F. A. Rainey, and H. Hippe.** 1999. Description of *Desulfotomaculum* sp. Groll as *Desulfotomaculum gibsoniae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:1801-1808.

■ **Kurr, M., R. Huber, H. König, H. W. Jannasch, H. Fricke, A. Trincone, J. K. Kristjansson, and K. O. Stetter.** 1991. *Methanopyrus kandelri*, gen. nov. and sp. nov. Represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. Arch. Microbiol. **156**:239-247.

■ **Küsel, K., and H. L. Drake.** 1999. Microbial turnover of low molecular weight organic acids during leaf litter decomposition. Soil Biol. Biochem. **31**:107-118.

■ **Kuypers, M. M., A. O. Sliekers, G. Lavik, M. Schmid, B. B. Jorgensen, et al.** 2003. Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. Nature. **422**:608-611.

■

L

■ **L'Haridon, S., V. Cilia, P. Messner, G. Raguene, A. Gambacorta, et al.** 1998. *Desulfobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov. a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep sea hydrothermal vent. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:701-711.

■ **Lauerer G., J. K. Kristjansson, T.A. langworthy, H. König, and K. O. Stetter.** 1986. *Methanothermus sociabilis* sp. nov., a second

species within the *Methanothermaceae* growing at 97°C. Syst. Appl. Microbiol. **8**: 100-105.

■ **Laverman, A. M., J. Switzer Blum, J. K. Schaefer, E. J. P. Phillips, D. R. Lovley, and R. S. Oremland.** 1995. wth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. Appl. Environ. Microbiol. **61**:3556-3561.

■ **Le Gall J., A. V. Xavier.** 1996. Anaerobes response to oxygen: The sulfate-reducing bacteria. Anaerobe **2**: 1-9.

■ **Leadbetter, J. R.** 2003. Cultivation of recalcitrant microbes cells are alive, well and revealing their secrets in the 21 st century laboratory. Curr. Opin. Microbiol. **6**:274-281.

■ **Leclerc, M., C. Delbes, R. Moletta, and J. J. Godon.** 2001. Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. FEMS. Microbiol. Ecol. **34**:213-220.

■ **Leclerc, M., J.-P. Delgenes, and J. J. Godon.** 2004. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single stranded conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. Environ. Microbiol. **6**:809-819.

■ **Lee, D.-H., Y.-G. Zo, and S.-J. Kim.** 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. Appl. Environ. Microbiol. **62** :3112-3120.

■ **Lee, M. D., J. M. Odom, R. J. Buchanan.** 1998. New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: insights from the field. Annu. Rev. Microbiol. **52**:423-452.

■ **Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1289-1297.

■ **Lehours A. C., Fonty G.** 2004. Les bactéries sulfato-réductrices dans les écosystèmes lacustres anaérobies : exemple du Lac Pavin. Bull. Soc. Fr. Microb. Vol.19, N° 2.

■ **Lehours, A. C., C. Bardot, A. Thénot, D. Debroyas, and G. Fonty.** 2005. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique

meromictic lake in France. Appl. Environ. Microbiol. **71** :7382-7400.

■ **Li, L., C. Kato, K. Horikoshi.** 1999. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-sea area, the japan trench. Mar. Biotechnol. **1**:391-400.

■ **Liesack, W. and E. Staeckebrandt.** 1992. Occurence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J. Bacteriol. **174**:5072-5078.

■ **Liesack, W., and K. Finster.** 1994. Phylogenetic analysis of five strains of gram-negative, obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria and description of *Desulfuromusa* gen. nov., including *Desulfuromusa kysingii* sp. nov., *Desulfuromusa bakii* sp. nov., and *Desulfuromusa succinoxidans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:743-758.

■ **Liesack, W., F. Bak, J. U. Kreft, E. Stackebrandt.** 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. Arch. Microbiol. **162**:85-90.

■ **Lindhal, P. A., and B. Chang.** 2001. The evolution of acetyl-CoA synthase. Orig. Life Evol. Biosph. **31**:403-434.

■ **Lindström, E. S., and E. Leskinen.** 2002. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16SrDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. Microb. Ecol. **44**:1-9.

■ **Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4516-4522.

■ **Liu, W. T. T. L. Marsh, and L. J. Forney.** 1998. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. Water Sci. Technol. **37**:417-422.

■ **Llyod, J. R., and L. E. Macaskie.** 1996. A novel phosphorimager-based technique for monitoring the microbial reduction of technetium. Appl. Environ. Microbiol. **62**:578-582.

■ **Lloyd, J. R., and D. R. Lovley.** 2001. Microbial detoxification of metals and

radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:248-253.

■ **Llyod, J. R., C. Leang, A. L. Hodges Myerson, M. V. Coppi, S. Cuifo, B. Methe, S. J. Sandler, and D. R. Lovley.** 2003. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c -type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* **369**:153-161.

■ **Lochmeyer, C., J. Koch, and G. Fuchs.** 1992. Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-coenzyme a (CoA) and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **174**:3621-3628.

■ **Lomans, B. P., P. Leijdekkers, J. J. Wesseling, P. Bakkes, A. Pol, et al.** 2001. Obligate sulfide-dependent degradation of methoxylated aromatic compounds and formation of methanethiol and dimethyl sulfide by a freshwater sediment isolate, *Parasporobacterium paucivorans* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4017-4023.

■ **Lonergan, D. J., H. L. Jenter, J. D. Coates, E. J. Phillips, T. M. Schmidt, and D. R. Lovley.** 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:2402-2408.

■ **Lopez-Garcia, P., C. Brochier, D. Moreira, and F. Rodriguez-Valera.** 2004. Comparative analysis of a genome fragment of an uncultivated mesopelagic crenarchaeote reveals multiple horizontal gene transfers. *Environ. Microbiol.* **6**:19-34.

■ **Lorenz, P., K. Liebeton, F. Niehaus, and J. Eck.** 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:572-577.

■ **Lovley, D. R.** 1987. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review. *Geomicrobiol.* **5**:375-399.

■ **Lovley, D. R.** 1991. Dissimilatory Fe(II) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* **55**:259-287.

■ **Lovley, D. R.** 1992. Microbial oxidation of organic matter coupled to the reduction of Fe(III) and Mn(IV) oxides. In *Biomineralisation Processes*, pp. 101-114. Skinner, H. C. W. and R. W. Fitzpatrick (Eds.).

■ **Lovley, D. R.** 1993. Dissimilatory metal reduction. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**:263-290.

■ **Lovley, D. R.** 1995. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J. Indust. Microbiol.* **14**:85-93.

■ **Lovley, D. R.** 1995. Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Adv. Agron.* **54**:175-231.

■ **Lovley, D. R.** 1997a. Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:305-313.

■ **Lovley, D. R.** 1997b. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *J. Indust. Microbiol.* **18**:75-81.

■ **Lovley, D. R.** 2000. Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation.* **11**:107-116.

■ **Lovley, D. R.** 2000. Fe(III) and Mn(IV) reduction, p.3-30. In D. R. Lovley (ed.), *Environmental microbe-metal interactions*. ASM Press, Washington, D. C.

■ **Lovley, D. R.** 2001. Anaerobe to the rescue. *Science.* **293**:1444-1446.

■ **Lovley, D. R.** 2003. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reducing prokaryotes. Accessible via le site "The Prokaryotes": <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/419/COMPLETE.htm>

■ **Lovley, D. R., M. J. Klug.** 1983. Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:187-192

■ **Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips.** 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:683-689.

■ **Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips.** 1987. Rapid assay for microbially reducible iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1536-1540.

■ **Lovley D. R., and E. J. P. Phillips.** 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1472-1480.

■ **Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips.** 1989. Requirement for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe (III)-

reducing sediments. Appl. Environ. Microbiol. **55**:3234-3236.

■ Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, and D. J. Lonergan. 1989. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese by *Alteromonas putrefaciens*. Appl. Environ. Microbiol. **55**:700-706.

■ Lovley, D. R., M. J. Baedeker, D. J. Lonergan, I. M. Cozzarelli, E. J. P. Phillips, and D. I. Siegel. 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. Nature **339**:297-299.

■ Lovley, D. R., E. J. Phillips, Y.A. Gorby, and E. R. Landa. 1991. Microbial reduction of uranium. Nature **350**:413-416

■ Lovley, D. R., E. E. Roden, E. J. P. Phillips, and C. Woodward. 1993a. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. Marine Geol. **113**:41-53.

■ Lovley, D. R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. Phillips, et al. 1993b. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganisms capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. Arch. Microbiol. **159**: 336-344.

■ Lovley, D. R., J. C. Woodward, and F. H. Chapelle. 1994. Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. Nature **370**:128-131.

■ Lovley, D. R., J. D. Coates, J. C. Woodward, and E. J. P. Phillips. 1995a. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. Appl. Environ. Microbiol. **61**:953-958.

■ Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, D. J. Lonergan, and P. K. Widman. 1995b. Fe(III) and S⁰ reduction by *Pelobacter carbinolicus*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2131-2138.

■ Lovley, D. R., J. D. Coates, E. L. Blunt-Harris, E. J. P. Phillips, and J. C. Woodward. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. Nature **382**:445-448.

■ Lovley, D. R., and J. D. Coates. 1997. Bioremediation of metal contamination. Curr. Opin. Biotech. **8**:285-289.

■ Lovley, D. R., J. D. Coates, D. A. Saffarini, and D. J. Lonergan. 1997. Dissimilatory iron reduction. In: G. Winkelman and C. J. Carrano (Eds.) Iron and related transition metals in microbial metabolism.

Harwood Academic Publishers Switzerland, pp. 187-215.

■ Lovley, D. R., J. L. Fraga, E. L. Blunt-harris, L. A. Hayes, E. J. P. Phillips, and J. D. Coates. 1998. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. Acta Hydrochim. Hydrobiol. **26**: 152-157.

■ Lovley, D. R., and E. L. Blunt-Harris. 1999. Role of humics-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) reduction . Appl. Environ. Microbiol. **9**:4252-4254.

■ Lovley, D. R., J. D. Fraga, D. Coates, and E. L. Blunt-Harris. 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. Environ. Microbiol. **1**:89-98.

■ Lovley, D. R., J. L. Fraga, J. D. Coates, E. L. Harris. 1999. Humics as electron donor for anaerobic respiration. Environ. Microbiol. **1**:89-98.

■ Lovley, D. R., and R. T. Anderson. 2000. Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metals contaminants in the subsurface. Hydrogeol. J. **8**:77-88.

■ Lovley, D. R., K. Kashefi, M. Vargas, J. M. Tot, and E. L. Blunt-Harris. 2000. Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. Chem. Geol. **169**:289-298.

■ Ludwig, W., S. H. Bauer, M. Bauer, I. Held, G. Kirchhof, et al. 1997. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. FEMS Microbiol. Lett. **153**:181-190.

■ Ludwig, W., and H-P. Klenk. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. New York: Springer. 49-65.



M

■ Madrid, V., G. Taylor, M. Scranton, and A. Christoserdov. 2001. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1663-1674.

■ MacBeth, T. W., D. E. Cummings, S. Spring, L. M. Petzke, and K. S. Sorenson,

- Jr. 2004. Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from in situ biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7329-7341.
- **Madsen, E. L.** 2005. Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Microbiology*. **3**: 439-446.
- **Magnuson, T. S., A. L. Hodges-Myerson, and D. R. Lovley.** 2000. Characterization of a membrane bound NADH-dependent Fe³⁺ reductase from the dissimilatory Fe³⁺-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**:205-211.
- **Magnuson, T. S., N. Isoyama, A. L. Hodges-Myerson, G. Davidson, M. J. Maroney, G. G. Geesey, and D. R. Lovley.** 2001. Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89Kda Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* **359**:147:152.
- **Makarova, K. S., and E. V. Koonin.** 2003. Comparative genomics of *Archaea*. How much have we learned in six years, and what's next? *Genome Biol.* **4**:115.
- **Mallet, C., and D. Debroas.** 2000. Regulation of aminopeptidase activity in the sediment of a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **149**:327-335.
- **Maloney, S. E., T. S. Marks, and R. J. Sharp.** 1997. Degradation of 3-chlorobenzoate by thermophilic microorganisms. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**:441-444.
- **Manefield, M., A. S. Whiteley, R. I. Griffiths, M. J. Bailey.** 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** :5367-5373.
- **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxyribonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
- **Markosyan, G. E.** 1972. A new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* gen. nov., sp. nov. *Biol. Zh. Armen.* 25-26.
- **Marsh, T. L., W. T. Liu, L. J. Forney, and H. Cheng.** 1998. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Water Sci. Technol.* **37**:455-460.
- **Marsh, T. L., P. Saxman, J. Cole, and J. Tiedje.** 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based reasearch tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3616-3620.
- **Martin, J. M.** 1985. The Pavin crater lake. In W. Stumm, ed., *Chemical processes in lakes*, Wiley New York, N. Y., pp. 169-188.
- **Martiny J. B. H., B. J. M. Bohannan, J. H. Brown, R. K. Colwell, J. A. Furhman, J. L. Green, et al.** 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature* **4**: 102-112;
- **Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston, E. F. DeLong.** 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** :50-56.
- **May, R. M.** 1988. How many species are there on Earth?. *Science.* **247**:1441-1149.
- **Mayr, E.** 1998. Two empires or three? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9720-9723.
- **McBeath, G., and S. L. Schreiber.** 2000. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**:1760-1763.
- **McGregor, B. J., D. P. Moser, E. W. Alm, K. H. Nealson, D. A. Stahl.** 1997. *Crenarchaeota* in Lake Michigan sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** :1178-1181.
- **McInerney, M. J., and M. P. Bryant.** 1981. Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. In: S. S. Sofer and O. R. Zaborsky (Eds.) *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*. Plenum Press New York, NY, pp. 277-296.
- **McInerney, J. O., M. Wilkinson, J. W. Patching, T. M. Embley, R. Powell.** 1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** :1646-1648.
- **McInerney, J. O., M. Mullarkey, M. E. Wernecke, R. Powell.** 1997. Phylogenetic analysis of Group I marine archaeal rRNA sequences emphasizes the hidden diversity within the primary group *Archaea*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **264**:1663-1669.

- Mechichi, T., M. Labat, J. L. Garcia, P. Thomas, and B. K. Patel. 1999. *Sporobacterium olearium* gen. nov., sp. nov., a new methanethiol-producing bacterium that degrades aromatic compounds, isolated from an olive mill wastewater treatment digester. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1741-1748.
- Meckenstock, R. U. 1999. Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**:67-73.
- Meybeck, M., J. M. Martin, and P. Olive. 1975. Géochimie des eaux et des sédiments de quelques lacs volcaniques du Massif Central. *Vehr. Int. Ver. Limnol.* **19**, pp. 1150-1165.
- Michaelis W., R. Seifert, K. Nauhaus, T. Treude, *et al.* 2002. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**:1013-1015.
- Michard, G. 1971. Theoretical model for manganese distribution in calcareous sediment cores. *J. Geophys. Res.* **76**:2179-2186.
- Michard, G., E. Viollier, D. Jézéquel, and G. Sarazin. 1994. Geochemical study of a crater lake. The Pavin lake, France: Identification, location, and quantification of the chemical reactions in the lake. *Chem. Geol.* **115**:103-115.
- Michotey, V., V. Mejean, and P. Bonin. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1564-1571.
- Millero, F. J. 1991. The oxidation of H₂S with O₂ in the Black Sea. In Izdar and Murray (ed.): *Black Sea Oceanography*, NATO ASI Series, Kluwer, C. 351, pp. 206-227.
- Mohamed, M. E., B. Seyfried, A. Tschech, and G. Fuchs. 1993. Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-coenzyme A and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. Evidence for an alpha-oxidation mechanism. *Arch. Microbiol.* **159**:563-573.
- Mohamed, M. E., A. Zaar, C. Ebenau-Jehle, and G. Fuchs. 2001. reinvestigation of a new type of aerobic benzoate metabolism in the proteobacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* **183**:1899-1908.
- Mohn, W. W., J. M. Tiedje. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**:482-507.
- Moran, N. A., M. A. Munson, P. Baumann, H. Ishikawa. 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* **253**:167-171.
- Moreira, D., F. Rodriguez-Valera, and P. Lopez-Garcia. 2004. Analysis of a genome fragment of a deep-sea uncultivated GroupII euryarchaeote containing 16S rDNA, a spectinomycin-like operon and several energy metabolism genes. *Environ. Microbiol.* **6**:959-969.
- Morris, R. M., M. S. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, W. A; Siebold, C. A. Carlson, S. J. Giovannoni. 2002. SAR11 clade dominates ocean subsurface bacterioplankton communities. *Nature.* **420**:806-810.
- Moter, A., and U. B. Göbel. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **41**:85-112.
- Mulder, A., A. A. Van de Graaf, L. A. Robertson, J. G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**:177-183.
- Müller, J. A., A. S. Galushko, A. Kappler, and B. Schink. 1999. Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-Hydroxybenzylsuccinate. *Arch. Microbiol.* **172**:287-294.
- Müller, J. A., A. S. Galushko, A. Kappler, and B. Schink. 2001. Initiation of anaerobic degradation of *p*-cresol by formation of 4-hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. *J. Bacteriol.* **183**:752-757.
- Murray, A. E., J. T. Hollibaugh, and C. Orrego. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2676-2680.
- Murray, A. E., C. M. Preston, R. Massana, L. T. Taylor, A. Blakis, K. Wu, E. F. DeLong. 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters off Anvers Island,

Antarctica. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2585-2595.

■ **Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Cur. Op. Microbiol. **2**:317-322.

■ **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59**:695-700.

■ **Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, and C. Wawer.** 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans A. D. I., van Elsas J. D. and de Bruijn F. J. (Eds.) Molecular Microbial Ecology Manual (3.4.4:pp. 1-27) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

■ **Muyzer, G., and K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek **73**:127-141.

■ **Myers, R. M., S. G. Fisher, L. S. Lerman, and T. Maniatis.** 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. **13**:3131-3145.

■ **Myers, C. R., and K. H. Nealson.** 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science **240**:1319-1321.

■ **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1992. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol. **174**:3429-3438.

■ **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1993. Ferric reductase is associated with the membranes of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. FEMS Microbiol. Lett. **108**:15-22.

■ **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1994. Ferric iron reduction-linked growth yields of *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Appl. Bacteriol. **76**:253-258.

■ **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1997. Cloning and sequence of *cymA* a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction

of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol. **179**:1143-1152.

■ **Myers, J. M., and C. R. Myers.** 1998. Isolation and sequence of *omcA*, a gene encoding a decaheme outer membrane cytochrome c of *Shewanella putrefaciens* MR-1, and detection of *omcA* homologs in other strains of *S. Putrefaciens*. Biochim. Biophys. Acta **1373**:237-251.

■ **Myers, J. M., and C. R. Myers.** 2000. Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. J. Bacteriol. **182**:67-75.



N

■ **Nauhaus, K., A. Boetius, M. Krueger, F. Widdel.** 2002. *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. Environ. Microbiol. **4**:296-305.

■ **Nealson, K-H., and D. Saffarini.** 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration. Annu. Rev. Microbiol. **48**:311-343.

■ **Neubauer, S. C., D. Emerson, J. P. Megonigal.** 2002. Life at the energetic edge: kinetics of circumneutral iron oxidation by lithotrophic iron-oxidizing bacteria isolated from the wetland-plant rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. **68**:3988-3995.

■ **Nevin, K. P., and D. R. Lovley.** 2000. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2248-2251.

■ **Nevin, K. P., and D. R. Lovley.** 2002a. Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. Geomicrobiol. J. **19**:141-159.

■ **Nevin, K. P., and D. R. Lovley.** 2002b. Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. Appl. Environ. Microbiol. **68**:2294-2299.

■ **Newman, J. R., and A. E. Keating.** 2003. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-Coil arrays. Science **300**:2097-2101.

- Nielsen, A. T., W-T. Liu, C. Filipe, L. Grady Jr., S. Molin, D. A. Stahl. 1999. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1251-1258.
 - Nilsen, R. K., J. Beeder, T. Thorstenson, and T. Torsvik. 1996. Distribution of thermophilic marine sulfate-reducers in north sea oil field waters and oil reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1793-1798.
 - Nold, S. C., E. D. Kopczynski, and D.M. Ward. 1996. Cultivation of aerobic chemoorganotrophic *proteobacteria* and gram-positive bacteria from a hot spring microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3917-3921.
 - Nozawa, T., and Y. Maruyama. 1988a. Anaerobic metabolism of phtalate and other aromatic compounds by a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **170**:5778-5884.
 - Nozawa, T., and Y. Maruyama. 1988b. Denitrification by a soil bacterium with phtalate and other aromatic compounds as substrates. *J. Bacteriol.* **170**:2501-2505.
-
-
- Ochsenreiter, T., D. Selezi, A. Quaiser, L. Bonch-Osmolovskaya, and C. Schleper. 2003. Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ. Microbiol.* **5**:787-797.
 - Ogier, S. 1999. Diagenèse précoce en domaine lacustre : étude des composés minéraux et organiques des sédiments récents du Lac d'Aydat (Puy de Dôme, France). Thèse Université d'Orléans, 323pp.
 - Ohkuma, M., and T. Kudo. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:461-468.
 - Olivier, L. 1939. Matériaux pour la connaissance limniologique des lacs MontDoriens. Impr. De Bussac, Clermont-Ferrand, 80p.
 - Olivier, L. 1952. Note sur la présence en été, dans le lac Pavin, d'une couche dépourvue d'oxygène vers 70m de profondeur. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **234**:743-745.
 - Olsen, G. J., D. L. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace. 1986. Microbial ecology and evolution : a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337-365
 - Olsen G. J., C. R. Woese. 1997. Archaeal genomics: an overview. *Cell.* **89**:991-994.
 - Oremland, R. S. 1988. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In Zehnder A. J. B (ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*, pp. 641-705. John Wiley and Sons, New York.
 - Oremland, R. S., and B. F. Taylor. 1978. Sulfate-reduction and methanogenesis in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**:209-214.
 - Oremland, R. S., S. E. Hoefft, J. M. Santini, N. Bano, R. A. Hollibaugh, J. T.Hollibaugh. 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4795-4802.
 - Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, E. F. DeLong. 2001a. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science.* **293**:484-487.
 - Orphan, V. J., K.-U. Hinrichs, W. Ussler III, C. K. Paull, L. T. Taylor, S. P. Sylva, J. M. Hayes, and E. F. DeLong. 2001b. Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1922-1934.
 - Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, E. F. DeLong. 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7663-7668.
 - Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, E. F. Delong. 2003. Mutiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold deep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7663-7668.
 - Osborn, A. M., E. R. B. Moore, and K. N. Timmis. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**:39-50.

■ **Ottow, J. C. G.** 1970. Selection, characterization and iron-reducing capacity of nitrate reductaseless (nit-) mutants of iron-reducing bacteria. *Z. Allg. Mikrobiol.* **10**:55-62.

■ **Ottow, J. C. G., and A. von Klotek.** 1969. Enzymatic reduction of iron oxide by fungi. *Appl. Microbiol.* **18**:41-43.

■ **Ottow, J. C. G., and H. Glathe.** 1971. Isolation and identification of iron reducing bacteria from gely soils. *Soil. Biol. Biochem.* **3**:43-55.

■ **Oude Elferink, S. J. W. H., H. T. S. Boschker, A. J. M. Stams.** 1998. Identification of sulfate-reducers and *Syntrophobacter* sp. In anaerobic granular sludge by fatty-acid biomarkers and 16S rRNA probing. *Geomicrobiol. J.* **15**:3-17.

■ **Ovreas, L., L. Forney, F. L. Daae, V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** :3367-3373.

■ **Oyaizu, H., B. Debrunner-Vossbrinck, L. Mandelco, J. A. Studier, C. R. Woese.** 1987. The green non-sulfur bacteria: a deep branching in the eubacterial line of descent. *Syst. Appl. Microbiol.* **9**:47-53.



P

■ **Pace, N. R.** 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**:463-470.

■ **Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**:734-740.

■ **Pace, N., R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen.** 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* **51**:4-12.

■ **Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9**:1-55.

■ **Palleroni, N. J.** 1997. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Ant V Leeuwenhoek* **72**:3-19.

■ **Pancost, R. D., J. S. Sinninghe Damsté.** 2003. Carbon isotopic compositions of

prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings. *Chem. Geol.* **195**:29-58.

■ **Pardue, M. L., and J. G. Gall.** 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**:600-604.

■ **Park, S. Y., H. Shimizu, S. Adachi, A. Nakagawa, I. Tanaka, K. Nakahara, H. Shoun, E. Obayashi, H. Nakamura, T. Iizuka, and Y. Shiro.** 1997. Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nature Struct. Biol.* **4**:827-832.

■ **Parsons, T. R., and J. D. H. Strickland.** 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. *Deep. Sea. Res.* **8**:211-222.

■ **Paster, B. J., W. Ludwig, W. G. Weisburg, E. Stackebrandt, R. B. Hespell, et al.** 1985. A phylogenetic grouping of the *Bacteroides*, *Cytophagas*, and certain *Flavobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 34-42.

■ **Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst.** 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**:3770-3783.

■ **Paul, J. H.** 1996. Carbon cycling : molecular regulation of photosynthetic carbon fixation. *Microb. Ecol.* **9** :1-55.

■ **Paul, E., and F. E. Clark.** 1989. Soil microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, p. 76.

■ **Pedersen, K., L. hallbeck, J. Arlinger, A. Erlandson, and N. Jahromi.** 1997. Investigation of the potential for microbial contamination of deep aquifers during drilling using 16S RNA gene sequencing and culturing methods. *J. Microbiol. Ecol.* **27** :269-279.

■ **Pelletier, J. P.** 1968. Un lac méromictique : le lac Pavin (Auvergne). *Ann. Sta. Biol. Besse en Chandesse.* **3** :147.

■ **Pelmont, J.** 1992. Bactéries et environnement; Adaptations physiologiques. Presse universitaires de Grenoble.

■ **Pender, S., M. Toomey, M. Carton, D. Eardly, J. W. Patching, E. Colleran, V. O'Flaherty.** 2004. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of

anaerobic hybrid reactors. *Water Res.* **38**:619-630.

■ **Pennisi, E.** 2002. Geobiologists: as diverse as the bugs they study. *Science*. **296**:1058-1060.

■ **Pfenning, N., and H. Biele.** 1976. *Desulfotomaculum acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* **110**:3-12.

■ **Phelp, C. D., and L. Y. Young.** 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* **10**:15-25.

■ **Philippe, L.** 1989. Bilan géochimique du fer et du phosphore dans un système lacustre eutrophe, le Lac d'Aydat. Thèse d'Université Paris 7, 186pp.

■ **Philippe, H.** 2000. Long branch attraction and protist phylogeny. *Protist*. **51**:307-316.

■ **Philippe, H., and J. Laurent.** 1998. How good are deep phylogenetic trees? *Cur. Opin. Genet. Dev.* **8**:616-633.

■ **Philippot, L., and O. Hojberg.** 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1446**:1-23.

■ **Pinkel, D., J. Ladegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segreaves, J. Lucas, J. Gray.** 1988. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9138-9142.

■ **Poulin, M.** 1996. Rapport d'avancement Projet INSU réactivité de l'interface eau-sédiment. Non publié

■ **Preston, C. M., K. Y. Wu, B. B. Prezelin, R. V. M. Jovine.** 1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. *Nature*. **371**:695-697.

■ **Preston, C. M., K. Y. Wu, T. M. Molinski, E. F. DeLong.** 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Crenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. Nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6241-6246.

■ **Pronk, J. T., J. C. De Bruyn, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2227-2230.

■ **Puig-Grajales, L., N. G. Tan, F. van der Zee, E. Razo-Flores, and J. A. Field.**

2000. Anaerobic biodegradability of alkylphenols and fuel oxygenates in the presence of alternative electron acceptors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:692-697.

Q

■ **Quaiser, A. et al.** 2002. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environ. Microbiol.* **4**:603-611.

■ **Quaiser, A. et al.** 2003. Acidobacteria from a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* **50**:563-575.

R

■ **Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.

■ **Rabus, R., T. Hansen, and F. Widdel.** 2000. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. Accessible via the site "The Prokaryotes": <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/274/COMPLETE.htm>

■ **Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, J. C. Murrell.** 2000. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**:646-649.

■ **Radajewski, S., I. R. McDonald, and J. C. Murrell.** 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr. Op. Biotechnol.* **14**:296-302.

■ **Ramachandra, N., E. Hainsworth, B. Bhullar, S. Eisenstein, B. Rosen, A. Y. Lau, J. C. Walter, and J. LaBaer.** 2004. Self-assembling protein microarrays. *Science* **305**: 86-90.

■ **Ramsing, N. B., H. Fossing, T. G. Ferdelman, F. Andersen, and B. Thamdrup.** 1996. Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) quantified by *in situ* hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1391-1404.

- **Rappé, M. S., S. A. Connon, K. L. Vergin, S. J. Giovannoni.** 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*. 418 :630-633.
- **Rappé, M. S., and S. J. Giovannoni.** 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.
- **Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1232-1240.
- **Raskin, L., B. E. Rittmann, and D. A. Stahl.** 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3847-3857.
- **Reeve, J. N.** 1992. Molecular biology of methanogens. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:165-191.
- **Reichenbecher, W., and B. Schink.** 1997. *Desulfovibrio inopinatus*, sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that egrades hydroxyhydroquinone. *Arch. Microbiol.* 168:333-344.
- **Reiter, W. D., P. Palm, and W. Zilling.** 1988. Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucleic. Acids Res.* 16:1-19.
- **Revsbech, N. P., and J. Sørensen.** 1990. Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York.
- **Reysenbach, A., L. J. Giver, G. S. Wickham, N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of RNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3417-3418.
- **Richards, F. A.** 1965. Anoxic basins and fjords. In *Chemical Oceanography*, ed. JP Riley, GG Skirrow, pp. 611-645. London: Academic.
- **Riesner, D., K. Henco, and G. Steger.** 1991. Temperature-gradient gel electrophoresis: a method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. In: *Advances in Electrophoresis* 4:169-250.
- **Roane, T. M., and S. T. Kellogg.** 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 42:593-603.
- **Roberts, J. L.** 1947. Reduction of ferric hydroxide by strains of *Bacillus polymyxa*. *Soil. Sci.* 63:135-140.
- **Rockne, K. J., J. C. Chee-Sanford, R. A. Sanford, B. P. Hedlund, J. T. Staley, and S. E. Strand.** 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1595-1601.
- **Roden, E. E., D. R. Lovley.** 1993. Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulforomonas acetoxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:734-742.
- **Roden, E. E., and R. G. Wetzel.** 1996. Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe (III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sediments. *Limnol. Oceanogr.* 41:1733-1748.
- **Rooney-Varga, J. N et al.** 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3056
- **Rosenbaum, V., and D. Reisner.** 1987. Temperature gradient gel electrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem.* 26:235-246.
- **Rossello-Mora, R. A., W. Ludwig, P. Kampf, R. Amann, and K-H. Schleifer.** 1995. *Ferrimonas balearica* gen. nov, sp. nov, a new marine facultative Fe(III)-reducing bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:196-202.
- **Rossello-Mora, R., and R. Amann.** 2001. The species concept for procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39-67.
- **Rothschild, L. J., and R. L. Mancinelli.** 2001. Life in extreme environments. *Nature.* 409: 1092-1100.
- **Rouvière P. E., and R. S. Wolfe.** 1988. Novel biochemistry of methanogenesis. *J. Biol. Chem.* 263:7913-7916.
- **Rouvière, P., L. Mandelco, S. Winker, and C. R. Woese.** 1992. A detailed phylogeny for the *Methanomicrobiales*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:363-371.
- **Rudolphi, A., A. Tschech, and G. Fuchs.** 1991. Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 155:238-248.

S

- **Saitou, N., and M. Nai.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- **Sanford, R. A., J. R. Cole, J. M. Tiedje.** 2002. Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:893-900.
- **Santini, J. M., L. I. Sly, R. D. Schnagl, J. M. Macy.** 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:92-97.
- **Scala, D. J., and L. J. Kerkhof.** 1998. Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**:61-68.
- **Scala, D. J., and L. J. Kerkhof.** 1999. Diversity of nitrous oxide reductase (nosZ) genes in continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1681-1687.
- **Scala, D. J., and L. J. Kerkhof.** 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1980-1986.
- **Schalk, J., S. Devries, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten.** 2000. A novel hydroxylamine oxidoreductase involved in the anammox process. *Biochemistry* **39**:5405-5412.
- **Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown.** 1995. Quantitative monitoring gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467-470.
- **Schink, B.** 1991. Syntrophism among prokaryotes, In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, and K. H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, NY, pp. 276-299.
- **Schink, B.** 1994. Diversity, ecology, and isolation of acetogenic bacteria. In: H. L. Drake (Ed.) *Acetogenesis*. Chapman and Hall New York, NY, pp. 197-235.
- **Schink, B.** 1997. Energetics of syntrophic cooperations in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:262-280.
- **Schink, B., and M. Bomar.** 1992. The genera *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobium*, and *Acetomaculum*. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K-H. Schleifer (Eds.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, pp. 1925-1936.
- **Schink, B., and M. Friedrich.** 1994. Energetics of syntrophic fatty acid degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:85-94.
- **Schink, B., and M. Friedrich.** 2000a. Phosphite oxidation by sulphate reduction. *Nature*. **406**:37.
- **Schink, B., B. Philipp, and J. Müller.** 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften*. **87**:12-23.
- **Schink, B., V. Thiemann, H. Laue, M. W. Friedrich.** 2002. *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Arch. Microbiol.* **177**:381-391.
- **Schink, B., A. J. M. Stams.** 2003. Accessible via le site "The Prokaryotes"-<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/419/COMPLETE.htm>
- **Schleper, C., G. Puhler, B. Kuhlmoorgen, W. Zillig.** 1995. Life at extremely low pH. *Nature*. **375**:741-742.
- **Schleper, C., W. Holben, H. P. Klenk.** 1997. Recovery of crenarchaeotal rDNA sequences from freshwater lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3367-3373.
- **Schleper, C. Population genomics of soil microbial communities.** 2004. 104th General meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, Louisiana.
- **Schleper, C., G. Jurgens, M. Jonuscheit.** 2005. Genomic studies of uncultivated Archaea. *Microbiology* **3**:479-488.
- **Schlesner, H., E. Stackebrandt.** 1986. Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family *Planctomycetaceae* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**:174-176.

- **Schloss, P. D., and J. Handelsman.** 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**:303-310.
- **Schmid, M.** 1997. Physikalische and chemische prozesse in Lac Pavin. Ursachen und folgen der stabile schichtung eines vulkanischen kratersees. Diplmarbeit ETH Zürich, 93pp.
- **Schmid, M., K. Walsh, R. Webb, W. I. Rijpstra, K. Van de Pas-Schoonen, et al.** 2003. *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:529-538..
- **Schmidt, J. M.** 1978. Isolation and ultra-structure of freshwater strains of Planctomyces. *Curr. Microbiol.* **1**:65-71.
- **Schmidt, T. M., E. F. Delong, and N. R. Pace.** 1991. Analysis of a picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**:4371-4378.
- **Schneider, S., M. E. Mohamed, and G. Fuchs.** 1997. Anaerobic metabolism of 1-phenylalanine via benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **168**:310-320.
- **Schnell, S., F. Bak, and N. Pfenning.** 1989. Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **152**:556-563.
- **Schönheit, P., H. Keweloh, and R. K. Thauer.** 1981. Factor F420 degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**:347-349.
- **Schönheit, P., and T. Schäfer.** 1995. Metabolisms of hyperthermophiles. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:26-75.
- **Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko, R. Amann.** 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3268-3273.
- **Schönhuber, W., B. Zarda, S. Eix, R. Rippka, M. Herdmann, W. Ludwig, R. Amann.** 1999. *In situ* identification of *Cyanobacteria* with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1259-1267.
- **Schopf, J. W., J. M. Hayes, and M. R. Walter.** 1983. Evolution of the earth's earliest ecosystems: Recent progress and unsolved problems. In: J. W. Schopf (Ed.) *Earth's Earliest Biosphere*. Princeton University Press Princeton, NJ, pp:361-384.
- **Schouten, S., S. G. Wakeham, E. C. Hopmans, J. S. Sinninghe Damsté.** 2003. Biogeochemical evidence that thermophilic archaea mediate the anaerobic oxidation of methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1680-1686.
- **Schröder, I., Johnson, S. de Vries.** 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **776**:1-21.
- **Schut, F., J. C. Gottschal, and P. A. Rudolf.** 1997. Isolation and characterization of the marine ultramicrobacterium *Shingomonas* sp. Strain RB2256. *FEMS Microbiol. Rev.* **20** :363-369.
- **Schwartzmann, U., and R. W. Fitzpatrick.** 1992. Iron minerals in surface environments. In: H. C. W. Skinner and R. W. Fitzpatrick (Eds.) *Biomineralization Processes of iron and Manganese*. Catena Verlag Germany. pp. 7-31.
- **Schwieger, F., and C. C. Tebbe.** 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4870-4876.
- **Seeliger, S., R. Cord-Ruwisch, and B. Schink.** 1998. A periplasmic and extracellular α -type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J. Bacteriol.* **180**:3686-3691.
- **Sheffield, V. C., D. R. Cox, and R. M. Myers.** 1989. Attachment of a 40-bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:232-236.
- **Sheffield V. C., J. S. Beck, E. M. Stone, R. M. Myers.** 1992. A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, GC-rich sequence to PCR-amplified DNA. *Biotechniques* **12**:386-387.

- Sieburth, J. McN., V. Smetacek, and J. Lenz. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* **23**:1256-1263.
- Slobodkin, A., A-L. Reysenbach, N. Strutz, M. Dreier, and J. Wiegel. 1997. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a continental hot spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:541-547.
- Smith, D. W. 1993. Ecological actions of sulfate-reducing bacteria, p. 161-188. In J. M. Odom and J. R. Singleton (ed.), *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York.
- Smith, D.R., L. A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, et al. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: Functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**:7135-7155.
- Smith, R. L., et al. 2001. *Environ. Sci. Technol.* **35**. 196
- Smolenski, W. J., and J. M. Sulfit. 1987. Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:710-716.
- Snel, B., P. Bork, M. A. Huynen. 1999. Genome phylogeny based on gene content. *Nat. Genet.* **21**:108-110.
- Sniegowski, P. 1999. The genomics of adaptation in yeast. *Curr. Biol.* **9**:897-898.
- Snoeyenbos-West, O. L., K. P. Nelvin, D. R. Lovley. Enrichment of *Geobacter* species in response to stimulation of Fe(III) reduction in sandy aquifer sediments. *Microbial. Ecol.* **39**:153-167.
- Song, B., L. Y. Young, and N. J. Palleroni. 1998. Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:889-894.
- Song, B., M. M. Häggblom, J. Zhou, J. M. Tiedje, and N. J. Palleroni. 1999. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that egrade aromatic compounds and descriptions of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1129-1140.
- Sorensen, A. H., V. L. Torsvic, T. Torsvic, L. K. Poulsen, B. K. Ahring. 1997. Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3043-3050.
- Sørensen, K. B., K. Finster, N. B. Ramsing. 2001. Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate, and methanol as possible electron shuttles. *Microb. Ecol.* **42**:1-10.
- Sorokin, Y. I. 1957. On the ability of sulfate reducing bacteria to utilize methane for the reduction of sulfate to hydrogen sulfide. *Mikrobiologiya.* **115**: 816.
- Spear, R. N., S. Li, E. V. Nordheim, J. H. Andrews. 1999. Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. *J. Microbiol. Methods* **35**:101-110.
- Spring, S., R. Schulze, J. Overmann, K-H. Schleifer. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:573-590.
- Springer, N., W. Ludwig, B. Philipp, and B. Schink. 1998. *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol degrading, strictly anaerobic denitrifying bacter.
- Stackebrandt, E., C. R. Woese. 1981. The evolution of prokaryotes. In *molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution*, ed. MJ Carlile, JR Collins, BEB Mosely, 32:1-31. Cambridge: Cambridge Univ. Press. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:953-956.
- Stackebrandt, E., R. G. E. Murray, H. G. Truper. 1988. *Proteobacteria classis* nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38** :321-325.
- Stackebrandt, E., U. Wehmeyer, and B. Schink. 1989. The phylogenetic status of *Pelobacter acidigallici*, *Pelobacter venetianus*, and *Pelobacter carbinolicus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**:257-260.
- Stackebrandt, E., W. Liesck, B. M. Göebel. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rRNA analysis. *FASEB J.* **7**:232-236.

- Stackebrandt, E., and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
- Stackebrandt, E., I. Kramer, J. Swiderski, and H. Hippe. 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **24**:253-258.
- Stahl, D.A., and Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes, p 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, United Kingdom.
- Stahl D. A., S. Fishbain, M. Klein, B. J. Baker, M. Wagner. 2002. Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**. 189-195.
- Staley, J. T. 1973. Budding bacteria of the *Pasteuria-Blasobacter* group. *Can. J. Microbiol.* **19**:609-614.
- Staley, J. T., and A. Konopka. 1985. Measurements of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39** :321-346.
- Stams, A. J. M., J. B. van Dijk, C. Dijkema, and C. M. Plugge. 1993. Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1114-1119.
- Starkey, R. L., and H. O. Halvorson. 1927. Studies on the transformation of iron in nature. II. Concerning the importance of microorganisms in the solution and precipitation of iron. *Soil. Sci.* **24**:381-402.
- Stears, R. L, T. Martinsky, and M. Shena. 2003. Trends in microarray analysis. *Nature Med.* **9**:140-145.
- Stein, J. T., T. L. Marsh, K. Y. Wu, H. Shizuga, and E; F. Delong. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40 kilobase-pair genome fragment from a planktonic archaeon. *J. Bacteriol.* **178**:591-599.
- Stephenson, M. 1947. Some aspects of hydrogen transfer. *Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **12**:33-48.
- Stetter, K. O. 1988. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov, sp. nov. a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**:172-173.
- Stetter, K., O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.* **452**:22-25.
- Stetter, K. O., M. Thomm, J. Winter, G. Widgruber, H. Huber, W. Zillig, D. Janecovic, H. König, P. Palm, and S. Wunderl. 1981. *Methanothermus fervidus* sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an icelandic hot spring. *Zentralbl Mikrobiol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig Reihe.* **C2**: 166-178.
- Stewart, V. 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in Enterobacteria. *Microbiol. Rev.* **52**:190-232.
- Straub, K. L., and B. E. E. Buchholz-Cleven. 1998. Enumeration and detection of anaerobic ferrous-iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4846-4856.
- Straub, K. L., M. Benz, and B. Schink. 1999. *Rhodovulum iodosum* sp. nov and *Rhodovulum robiginosum* sp. nov., two new marine phototrophic ferrous-iron oxidizing purple bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:729-735.
- Straub, K. L., M. Benz, and B. Schink. 2001. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:181-186.
- Strous, M., J. J. Heijnen, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool to study very slowly growing micro-organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:589-596.
- Strous, M., J. A. Fuerst, E. H. M. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, *et al.* 1999. Missing litotroph identified as new *planctomycete*. *Nature* **400**:446-449.
- Strous, M., J. G. Kuenen, J. A. Fuerst, M. Wagner, M. S. Jetten. 2002. The anammox case: a new experimental manifesto

for microbiological eco-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:693-702.

■ **Strous, M., and M. S. M. Jetten.** 2004. Anaerobic oxydation of methane and ammonium. *Annu. Rev. Microbiol.* **58** :99-117.

■ **Stumm, W., and J. J. Morris.** 1967. Measured oxidation potentials significance, In equilibrium concepts in natural water systems, *Amer. Chem. Soc. Adv. Serie*, **67**:270-286.

■ **Stumm, W., and J. J. Morgan.** 1981. *Aquatic chemistry*, 2nd ed. Wiley-Interscience, New York.

■ **Sugden, A., C. Ash, B. Hanson, and J. Smith.** 2003. Where do we go from here? *Science*. **302**:1906.

■ **Summons, R. E., L. L. Jahne, Z. Roksandic.** 1994. Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria. Relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**:2853-2863.

■ **Suzuki, M., and S. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625-630.

T

■ **Takai, K. D., and K. Horikoshi.** 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**:1285-1297.

■ **Takai, K., D. P. Moser, M. DeFlaun, T. C. Onstott, and J. K. Fredrickson.** 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** :5750-5760.

■ **Tani, M., T. Higashi, and S. Nagatsuka.** 1993. Dynamics of low-molecular weight aliphatic carboxylic acids (LACAs) in forest soils. In: Amount and composition of LACAs in different types of forest soils. *Soil Sci. Plant. Nutr.* **39**:485-495.

■ **Tawfiki,Hajji, K., F. Lepins, J. G. Bisaillon, and R. Beaudet.** 1999. Simultaneous removal of phenol, *ortho*- and *para*-cresol by mixed anaerobic consortia. *An. J. Microbiol.* **45**:318-325.

■ **Tebo, B. M., and A. Y. Obraztsova.** 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with

Cr(IV), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**:193-198.

■ **Teske, A., K. U. Hinrichs, V. Edgcomb, A. D. V. Gomez, S. P. Sylva, et al.** 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1994-2007.

■ **Thamdrup, B.** 2000. Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. In: *Adv. Microb. Ecol.*, Vol. 16 (Schink, B., Ed.), pp. 41-84. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

■ **Thauer, R. K.** 1990. Energy metabolism of methanogenic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1018**:256-259.

■ **Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker.** 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**:100-180.

■ **Thompson, J. R., L. A. Marcellino, and M. F. Polz.** 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Ac. Res.* **30**:2083-2088.

■ **Thomsen, T. R., K. Finster, N. B. Ramsing.** 2001. Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1646-1656.

■ **Thurman, E. M.** 1985. *Organic geochemistry of natural waters*. Martinus Nijhoff and Dr W. Jonk publishers, Dordrecht, 497p.

■ **Todorov, J. R., A. Y. Chistoserdov, J. Y. Aller.** 2000. Molecular analysis of microbial communities in mobile deltaic muds of Southeastern Papua New Guinea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**:147-155.

■ **Tor, J. M., and D. R. Lovley.** 2001. Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environ. Microbiol.* **3**:281-287.

■ **Torvisk, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae.** 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:782-787.

■ **Torsvik, V., L. Ovreas, T. F. Thingstad.** 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics and controlling factors. *Science*. **296**:1064-1066.

■ Treusch, A. H., et al. 2004. Characterization of large-insert DNA libraries from soil from environmental genomic studies of Archaea. *Environ. Microbiol.* **6**:970-980.

■ Trimmer, M., J. C. Nicholls, B. Deflandre. 2003. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames Estuary, United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6447-6454.

■ Troshanov, E. P. 1968. Iron and manganese reducing microorganisms in ore-containing lakes of the Karelian Isthmus. *Microbiology* **37**:786-790.

■ Tsapin, A. I., K. H. Nealson, T. Myers, M. A. Cusanovich, J. Van Beuumen, L. D. Crosby, B. A. Feinberg, C. Zhang. 1996. Purification and properties of a low-redox-potential tetraheme cytochrome c3 from *Shewanella putrefaciens*. *J. Bacteriol.* **178**:6386-6388.

■ Tschech, A., and G. Fuchs. 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* **148**:213-217.



U

■ Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, S. J. Giovannoni. 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557-572.



V

■ Valentine, D. L. 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:271-282.

■ Vallaes, T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macharet, G. Laguerre, and G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in *rhizobia* and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**:279-285.

■ Van Bodegom, P. M., J. C. M. Scholten, E. E. Roden, and A. J. M. Stams. 2004. Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microb. Ecol.* **49**:261-268.

■ Vancanneyt, M., F. Schut, C. Snauwaert, J. Goris, J. Swings, and J. C. Gottschal. 2001. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:73-79.

■ Van de Graaf, A. A., P. De Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten, and J. G. Kuenen. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **142**:2187-2196.

■ Van de Graaf, A. A., P. De Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten, J. G. Kuenen. 1997a. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **142**:2184-2196.

■ Van de Graaf, A. A., P. De Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten, J. G. Kuenen. 1997b. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **143**:2415-2421.

■ Van der Maarel, M. J. E. C., R. R. E. Artz, R. Haanstra, L. J. Forney. 1998. Association of marine *Archaea* with the digestive tracts of two marine fish species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2894-2898.

■ Van der Meer, M. T. J., S. Schouten, J. S. Sinninghe Damsé. 1998. The effect of the reversed tricarboxylic-acid cycle on the ¹³C contents of bacterial lipids. *Org. Geochem.* **28**:527-533.

■ Van der Meer, M. T. J., S. Schouten, J. W. De Leeuw, D. M. Ward. 2000. Autotrophy of green non-sulphur bacteria in hot spring microbial mats: biological explanations for isotopically heavy organic carbon in the geological record. *Environ. Microbiol.* **2**:428-435.

■ Van der Meer, M. T. J., S. Schouten, B. E. Dongen, W. I. C. Rijpstra, G. Fuchs, J. S. Sinninghe Damsté, J. W. de Leeuw, D. M. Ward. 2001. Biosynthetic controls on the ¹³C contents of organic components in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Biol. Chem.* **14**:10971-10976.

■ Van der Woude, B. J., M. De Boer, N. M. Van der Put, F. M. Van der Geld, R. A. Prins, and J. C. Gottschal. 1994. Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids by

photoheterotrophic bacteria. FEMS microbiol. Lett. **119**:199-207.

■ **Van Kuijk, B. L. M., E. Sclösser, and A. J. M. Stams.** 1998. Investigation of the fumarate metabolism of the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. Arch. Microbiol. **169**:346-352.

■ **Vargas, M., K. Kashefi, E. L. Blunt-Harris, and D. R. Lovley.** 1998. Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early earth. Nature. **395**:65-67.

■ **Venkateswaran, K., D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, et al.** 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:705-724.

■ **Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rush, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, et al.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science. **304**: 66-74.

■ **Vesey, G., D. Deere, M. R. Gauci, K. R. Griffiths, K. L. Williams, D. A. Veal.** 1997. Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. Cytometry **29**:147-154.

■ **Vetriani, C., H. V. Tran, and L. J. Kerkhof.** 2003. Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea. Appl. Envir. Microbiol. **69**: 6481-6488.

■ **Viollier, E., D. Jézéquel, G. Michard, M. Pépe, G. Sarazin, and P. Albéric.** 1995. Geochemical study of a crater lake (Pavin Lake, France): Trace-element behaviour in the monimolimnion. Chem. Geol. **125**:61-72.

■ **Viollier, E., G. Michard, D. Jézéquel, M. Pépe, and G. Sarazin.** 1997. Geochemical study of a crater lake: Lake Pavin, Puy de dôme, France. Constraints afforded by the particulate matter distribution in the element cycling within the lake. Chem. Geol. **142**:225-241.

■ **Von Wintzgerode, F., B. Selent, W. Hegemann, and U. B. Göble.** 1999. Phylogenetic analysis of an anerobic trichlorobenzene-transforming microbial consortium. Appl. Environ. Microbiol. **65**:283-286.

W

■ **Wagner, M. A., J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau, and D. A. Stahl.** 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. J. Bacteriol. **180**:2975-2982.

■ **Walker, J. C. G.** 1980. Atmspheric constraints on the evolution of magnetism. Origins of life. **10**:93-104.

■ **Walker, J. C. G.** 1987. Was the Archaean biosphere upside down? Nature **329**:710-712.

■ **Wallner, G., R. Amann, W. Beisker.** 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry **14**:136-143.

■ **Wallrabenstein, C., N. Gorny, N. Springer, W. Ludwig, and B. Schink.** 1995. Pure cultures of *Syntrophus buswelli*, definition of its physiological status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. **18**:62-66.

■ **Wang, G. C.-Y, and Y. Wang.** 1996. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. Microbiology **142**:1107-1114.

■ **Ward, B. B.** 1996. Nitrification and denitrification: probing the nitrogen cycle in aquatic environments. Microb. Ecol. **32**:247-261.

■ **Ward, D. M.** 1998. A natural species cocept for prokaryotes. Curr. Op. Microbiol. **1**:271-277.

■ **Ward, D. M., and M. R. Winfrey.** 1985. Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments, p. 219-286. In H. W. Jannasch and P. J. L. Williams (ed.), Advances in microbial ecology. Plenum Press, New York.

■ **Ward, D. M., and M. R. Winfrey.** 1985. Interactions between mehanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments. Adv. Aquat. Microbiol. **3**:141-179.

■ **Ward, D. M., M. M. Bateson, R. Weller, A. L. Ruff-Roberts.** 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. Adv. Microb. Ecol. **12**:219-286.

- **Ward, B. B., A. R. Cockcroft, and K. A. Filpatrick.** 1993. Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2285-293.
- **Ward-Rainey, N., F. A. Rainey, H. Schlesner, E. Stackebrandt.** 1995. Assignment of hitherto unidentified 16S rDNA species to a main line of descent within the domain bacteria. *Microbiology* **141**:3247-3250.
- **Ward, N., and C. M. Fraser.** 2005. How genomics has affected the concept of microbiology. *Curr. Op. Microbiol.* **8**:1-8.
- **Wawer, C., M. S. M. Jetten, and G. Muyzer.** 1997. Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase gene large subunit of *Desulfovibrio* spp. In environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. **63**:4360-4369.
- **Weiner J. M., D. R. Lovley.** 1998a. Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 775-778.
- **Weiner, J. M., D. R. Lovley.** 1998b. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1937-1939.
- **Weisburg, W., G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- **Weller, R., M. M. Bateson, B. K. Heimbuch, E. D. Kopczynski, D. M. Ward.** 1992. Uncultivated *Cyanobacteria*, *Chloroflexus*-like inhabitants, and spirochete-like inhabitants of a hot spring microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3964-3969.
- **White, M. F., S. D. Bell.** 2002. Holding it together:chromatin in the *Archaea*. *Trends Genet.* **18**:621-626.
- **Whiticar, M. J., E. Faber, M. Schoell.** 1986. Biogenic methane formation in marine and fresh-water environments: CO₂ reduction vs. Acetate fermentation –isotopic evidence. *Geoch. Cosmochim. Acta* **50**:693-709.
- **Whitman, W. B.** 1994. Autotrophic Acetyl Coenzyme A Biosynthesis. In *Methanogens Acetogenesis*, Chapman and Hall New York, NY, pp. 521-538.
- **Whitman, W. B., T. L. Bowen, and D. R. Boone.** 1992. The methanogenic bacteria. In Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. And Schleifer K-H. (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Pp. 719-767. Springer-Verlag, Berlin.
- **Whitman, W. B., D. C. Coleman, W. J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6578-6583.
- **Widdel, F.** 1988. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, p. 469-585. In A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- **Widdel, F.** 1992. The genus *Desulfomaculum*. In: *The Prokaryotes*, Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer, eds., pp. 1792-1799. Springer-Verlag, New York.
- **Widdel, F., and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3353-3378. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- **Widdel, F., S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assmus, and B. Schink.** 1993. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature* **362**:834-836.
- **Widdel F., and R. Rabus.** 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:259-276.
- **Wiegel, J., and Q. Wu.** 2000. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:1-15.
- **Wieringa, K. T.** 1936. Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Ant. V. Leeuwenhoek.* **3**:263-273.
- **Wieringa, K. T.** 1939-1940. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Ant. V. Leeuwenhoek.* **6**:251-262.
- **Wieringa, K. T.** 1941. Über die Bildung von Essigsäure aus Kohlensäure und Wasserstoff durch anaerobe Bazillen. *Brennstoff-Chemie.* **22**:161-164.
- **Wilkinson, I. J., N. Sangster, R. M. Ratcliff, P. A. Mugg, D. E. Davos, and J. A. Lanser.** 1990. Problems associated with

identification of *Legionella* species from the environment and isolation of six possible new species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:796-802.

■ **Wilson, E. O.** 1994. The diversity of life: Penguin.

■ **Wilson, M. S., C. Bakermans, and E. L. Madsen.** 1999. *In situ*, realtime catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:80-87.

■ **Wintzingerode, P., U. B. Göbel, and E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.

■ **Woese C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.

■ **Woese, C. R.** 1998a. Default taxonomy: Ernst Mayr's view of the microbial world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:11043-11046.

■ **Woese, C. R.** 1998b. The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6854-6859.

■ **Woese, C. R., L. J. Magrum, and G. E. Fox.** 1978. *Archaeobacteria*. *J. Mol. Evol.* **11**:245-252.

■ **Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke, G. E. Fox.** 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**:143-151.

■ **Woese, C. R., and G. J. Olsen.** 1986. Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Syst. Appl. Microbiol.* **7**:161-177.

■ **Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4576-4579.

■ **Wolf, Y. I., I. B. Rogozin, N. V. Grishin, R.L. Tatusov, E. V. Koonin.** 2001. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC Evol. Biol.* **1**:8

■ **Wolfe, R. S.** 1996. 1776-196: Alessandra Volta's combustible air. *ASM News* **62**:529-534.

■ **Wolin, M. J., and T. L. Miller.** 1982. Interspecies hydrogen transfer: 15 years later. *ASM news.* **48**:561-565.

■ **Wood, H. G., and L. G. Ljungdhal.** 1991. Autotrophic character of the acetogenic bacteria. In: J. M. Shively and L. L. Barton (Eds.) *Variations in autotrophic life*. Academic Press San Diego, CA, pp. 201-250.

■ **Wright, G. E., and M. T. Madigan.** 1991. Photocatabolism of aromatic compounds by the phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2069-2073.

■ **Wright, R. T., and J. E. Hobbie.** 1965. The uptake of organic solutes in lake water. *Limnol. Oceanogr.* **10**:22-28.

■ **Wuchter, C., S. Schouten, H. T. Boschker, and J. S. Sinninghe Damste.** 2003. Bicarbonate uptake by marine *Crenarchaeota*. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**:203-207.

■

Y

■ **Young, M., and S. T. Cole.** 1993. *Clostridium*. In: Sonenshein A. L., J. A. Hoch, R. Losick (eds.) *Bacillus subtilis* and other gram-positive organisms. American Society for Microbiology, Washington, DC., pp. 35-42.

■

Z

■ **Zarda, B., R. Amann, W. Wallner, K.-H. Schleifer.** 1991. Identification of single bacterial cells using dioxigenin-labelled rRNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2823-2830.

■ **Zehnder, A. J., and T. D. Brock.** 1979. Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:194-204.

■ **Zeikus, J. G., M. A. Dawson, T. E. Thompson, K. Ingvorsen, and E. C. Hatchikian.** 1983. Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **129**:1

■ **Zengler, K., J. Heider, R. Rossello-Mora, and F. Widdel.** 1999. Phototrophic utilisation of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris viridans*. *Arch. Microbiol.* **172**:204-212.

■ **Zengler, K., G. Toledo, M. Rappé, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, and M.**

Keller. 2002. Cultivating the uncultured. Proc. Natl. Acad. Sci. **99**:15681-15686.

■ **Zhang, C. L.** 2002. Stable carbon isotopes of lipid biomarkers: analysis of metabolites and metabolic fates of environmental microorganisms. Curr. Op. Biotechnol. **13**:25-30.

■ **Zhilina, T. N., E. N. Detkova, F. A. Rainey, G. A. Osipov, A. M. Lysenko, N. A. Kostrikina, and G. A. Zavarzin.** 1998. *Natronoincola histidinovprans* gen. nov. sp. nov., a novel alkaliphilic acetogenic anaerobe. Curr. Microbiol. **37**:177-185.

■ **Zuckerland, E., and L. Pauling.** 1965. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theoret. Biol. **8**:357-366.

■ **Zumft, W. G.** 1992. The denitrifying prokaryotes. In: The Prokaryotes (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H., Eds.), pp. 554-582. Springer Verlag, New York.

■ **Zumft, W. G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:533-616.

■ **Zumstein, E., R. Moletta, and J. J. Godon.** 2000. Examination of two years of community dynamics in an anerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. Environ. Microbiol. **2**:69-78.

■ **Zwart, G., B. C. Crump, M. P. Kamst-van Agterveld, F. Halgen, S-K. Han.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. Aquat. Microb. Ecol. **28**:141-155.

ANNEXES



ANNEXE 1 : COMPOSES AROMATIQUES COMPLETEMENT DEGRADEES EN CONDITIONS ANOXIQUES PAR DES CULTURES PURES OU DES CONSORTIA BACTERIEN

Substrats Aromatiques	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ -	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
Benzène	<i>Dechloromonas</i> (Coates <i>et al.</i> 2001)	Lovley 2000	. Lovley <i>et al.</i> 1995. . Phelps et Young 1999	Weiner et Lovley 1998	-
Toluène	. <i>Thauera aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995), EbN1, ToN1, mXyN1 (Rabus et Widdel 1995), pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999), EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996), T3, M3 Hess <i>et al.</i> 1997). . <i>Azoarcus</i> sp. T (Dolfing <i>et al.</i> 1990, Krieger <i>et al.</i> 1999). . <i>Dechloromonas</i> (Coates <i>et al.</i> 2001). . Phelps et Young (1999)	. <i>Geobacter metallireducens</i> (Lovley 1997) . Autre <i>Geobacter</i> sp. (Coates <i>et al.</i> 2001a, 2001b). . Phelps et Young 1999	. <i>Desulfobacula toluolica</i> Tol2 (Rabus <i>et al.</i> 1993) . <i>Desulfobacterium cetonicum</i> (Harms <i>et al.</i> 1999)	Phelps et Young 1999	<i>Blasochloris sulfoviridis</i> strain ToP1 Edwards et Grbic-Galic 1994.
Ethylbenzène	. EbN1, PbN1 (Rabus et Widdel 1995). . <i>Azoarcus strain</i> T (Harwood et Gibson 1988) . Phelps et Young 1999	Phelps et Young 1999	. Phelps et Young 1999 . Chen et Taylor 1997	Phelps et Young 1999.	
Styrène (Vinylbenzène)				Grbic-Galic <i>et al.</i> 1990	
o-Xylène		Phelps et Young 1999	. oXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999) . Phelps <i>et al.</i> 1999	Edwards et Grbic-Galic 1994	
m-Xylène	. pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999) . <i>Azoarcus toluovorans</i> Td15 (Song <i>et al.</i> 1999), mXyN1 (Rabus et Widdel 1995), T3 (Hess <i>et al.</i> 1997). . Phelps et Young 1999.	Phelps et Young 1999.	. mXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999) . Phelps et Young 1999.		
p-Xylène	Phelps et Young 1999	Phelps et Young 1999	Phelps et Young 1999		
o-Ethyltoluène			oXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999)		
m-Ethyltoluène			mXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999)		
p-Ethyltoluène	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
m-Isopropyltoluène			mXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999)		
p-Isopropyltoluène	pCyN1, pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
Naphthalène	NAP-3-1, NAP-3-2, NAP-4 (Rockne <i>et al.</i> 2000)		NaphS2 (Galushko <i>et al.</i> 1999)		
2-CH ₃ -Naphthalène			Annweiler <i>et al.</i> 2000		

Composés hydroxylés	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
Phénol	<i>T. aromatica</i> K172 Anders et al. 1995, Tschech et Fuchs 1987), ToN1, PbN1 (Rabus et Widdel 1995), EB1 (Ball et al. 1996)	<i>. Ferroglobus placidus</i> (Tor et Lovley 2001). <i>. G. metallireducens</i> GS15(Lovley et al. 1993)	<i>. Desulfotomaculum gibsoniae</i> (Kuever et al. 1999). <i>. Desulfoarculus</i> SOXT (Drzyzga et al. 1993) <i>. Desulfobacterium anilini</i> (Schnell et al. 1989)	Cervantes et al. 2000.	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> strains Khanna et al. 1992)
2-Ethylphénol		Puig-Grajales et al. 2000.			
4-Ethylphénol	EB1 (Ball et al. 1996)				
4-Hydroxyphenylethylalcool	EB1 (Ball et al. 1996)				
Catechol	<i>Azoarcus anaerobius</i> (Springer et al. 1998)	Cat2 (Schnell et al. 1989)	<i>Desulfobacterium anilini</i> (Schnell et al. 1989)	Healy et Young 1978	
Resorcinol	<i>Azoarcus anaerobius</i> (Springer et al. 1998)		Re10 (Schnell et al. 1989)		
Hydroquinone				<i>Syntrophus gentianae</i> (Wallrabenstein et al. 1995)	
Pyrogallol			<i>Desulfovibrio inopinatus</i> (Reinchenbecher et Schink 1997)	<i>. Holophage foetida</i> (Liesack et al. 1994). <i>. Sporobacterium olearium</i> (Mechichi et al. 1999)	
Phloroglucinol			<i>Desulfovibrio inopinatus</i> (Reinchenbecher et Schink 1997)	<i>. Holophage foetida</i> (Liesack et al. 1994). <i>. Sporobacterium olearium</i> (Mechichi et al. 1999)	R. palustris strains (Khanna et al. 1992)
2-Crésol	<i>Paracoccus</i> sp. (Rudolphi et al. 1991)	Puig-Grajales et al. 2000		Tawfiki Hajji et al. 1999	
3-Crésol	<i>Pseudomonas</i> sp. (Rudolphi et al. 1991)		<i>Desulfobacterium cetonicum</i> (Müller et al. 2001)	Tawfiki Hajji et al. 1999	
4-Crésol	<i>. PC-07</i> (Bossert et al. 1989) <i>. Paracoccus</i> sp. (Rudolphi et al. 1991) <i>. T. aromatica</i> K172 (Anders et al. 1995), T1 (Song et al. 1998), ToN1, mXyN1 (Rabus et Widdel 1999), pCyN1 (Harms et al. 1999). <i>. Azoarcus evansii</i> KB740 (Anders et al. 1995). <i>. Achromobacter</i> sp. (Hopper et al. 1991)	<i>G. metallireducens</i> GS15(Lovley et al. 1993)	<i>. Desulfobacula toluolica</i> Tol 2 (Rabus et al. 1993), PRTOLI (Beller et al. 1996) <i>. Desulfobacterium anilini</i> (Schnell et al. 1989) <i>. Desulfobacterium cetonicum</i> (Müller et al. 2001)	<i>. Cevantes</i> et al. 2000 <i>. Smolenski</i> et Suflita 1987	

Composés hydroxylés	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
p-Isopropylbenzyl alcool	pCyN1, pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
3-phényl-1-propanol	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
1-Phénylethanol	EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996)				
2-Phénylethanol	EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996)				
2-Phénoxyéthanol	EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996)				
Benzaldéhyde	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995), EbN1, PbN1 (Rabus et Widdel 1995). . EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996) . <i>Azoarcus evansii</i> KB740 (Anders <i>et al.</i> 1995), pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)	<i>Ferroglobus placidus</i> (Tor et Lovley 2001).	PRTOLI (Beller <i>et al.</i> 1996)		<i>R. palustris</i> strains (Khanna <i>et al.</i> 1992)
p-Ethylbenzaldehyde	pCyN1, pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
p-Isopropylbenzaldehyde	pCyN1, pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
Phenylacetaldehyde	EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996)				
Vanilline, Dehydrovanilline				Isolat gm-négative (Chen <i>et al.</i> 1988)	
Carboxylates	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
Benzoate	Toutes celles de cette liste exceptée pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)	Toutes celles de cette liste	La plupart de cette liste	. <i>Syntrophus buswellii</i> (Auburger et Winter 1995) . <i>Syntrophus gentianae</i> (Wallrabensetein <i>et al.</i> 1995) . <i>S. aciditrophicus</i> (Elshahed <i>et al.</i> 2001)	<i>R. palustris</i> , <i>Rhodomicrobium vanniellii</i> (Wright et Madigan 1991)
Phenylacétate	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995, Mohamed <i>et al.</i> 1993), ToN1, PbN1 (Rabus et Widdel 1995). . EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996) . <i>Azoarcus evansii</i> KB740 (Anders <i>et al.</i> 1995)	<i>G. metallireducens</i> GS15 (Lovley <i>et al.</i> 1993)	. PRTOLI (Beller <i>et al.</i> 1996) . <i>Desulfobacula toluolica</i> Tol2 (Rabus <i>et al.</i> 1993)		<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
4-OH-Phenylacétate	<i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995) EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996) <i>Azoarcus evansii</i> KB740 (Anders <i>et al.</i> 1995)				

Carboxylates	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
Phénylpropionate	<i>T. aromatica</i> (Anders <i>et al.</i> 1995)		PRTOLI (Beller <i>et al.</i> 1996) <i>Desulfobacterium anilini</i> (Schnell <i>et al.</i> 1989)	<i>Syntrophus buswellii</i> (Auburger et Winter 1995)	<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988, Elder <i>et al.</i> 1992)
3-Phénylpropionate	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
Phénylalkanoates C5-C10					<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988, Elder <i>et al.</i> 1992)
2-OH-Benzoate	<i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995)			Bisaillon <i>et al.</i> 1993	
3-OH-Benzoate	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995, Tschech et Fuchs 1997). . <i>T. aromatica</i> asl-3 (Heising <i>et al.</i> 1991) . <i>A. evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995, Tschech et Fuchs 1997).		<i>Sporotomaculum hydroxybenzoicum</i> (Brauman <i>et al.</i> 1998)		<i>R. palustris</i> (Khanna <i>et al.</i> 1992)
4-OH-Benzoate	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995, Tschech et Fuchs 1997). . <i>A. evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995)	<i>Ferroglobus placidus</i> (Tor et Lovley 2001)	. <i>Desulfoarculus</i> sp. (Drzyzga <i>et al.</i> 1993) . PRTOLI (Beller <i>et al.</i> 1996)		<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
3,5-di-OH-Benzoate	<i>T. aromatica</i> AR-1 (Gallus et Schink 1998)		Cat2 (Schnell <i>et al.</i> 1989)		
2-NH ₂ -Benzoate	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995, Lochmeyer <i>et al.</i> 1992). . <i>A. evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995)				
4-NH ₂ -Benzoate	<i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995)				
2-Cl-Benzoate	. Häggblom <i>et al.</i> 1993 . Häggblom <i>et al.</i> 1996. . Kazumi <i>et al.</i> 1995				
3-Cl-Benzoate	. 3CB-1 (Häggblom et Young 1999) . Häggblom <i>et al.</i> 1993 . Kazumi <i>et al.</i> 1995	Kazumi <i>et al.</i> 1995	. Häggblom <i>et al.</i> 1993 . Kazumi <i>et al.</i> 1995	. Häggblom <i>et al.</i> 1993 . Kazumi <i>et al.</i> 1995 . Maloney <i>et al.</i> 1997	. <i>R. palustris</i> DCP3 ((van der Woude <i>et al.</i> 1994), . <i>R. palustris</i> RCB100 ((Egland <i>et al.</i> 2001)
4-Cl-Benzoate	. Coshigano <i>et al.</i> 1994 . Häggblom <i>et al.</i> 1993 . Kazumi <i>et al.</i> 1995				
3-Fluorobenzoate	<i>A. evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995)				

Carboxylates	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
2-CH ₃ -Benzoate					
3-CH ₃ -Benzoate	. <i>T. aromatica</i> T1 (Song <i>et al.</i> 1998). . mXyN1 (Rabus et Widdel 1995).				
4-CH ₃ -Benzoate			oXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999)	Kleerebezem <i>et al.</i> 1999	
3,4,5,-Tri-CH ₃ -Benzoate	<i>T. aromatica</i> AR-1 (Gallus et Schink 1998)		mXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999)	<i>Sporobacterium olearium</i> SR1T (Mechichi <i>et al.</i> 1999)	
4-Ethylbenzoate	pCyN1, pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
4-Propylbenzoate	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
4-Isopropylbenzoate	pCyN1, pCyN2 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
Phenylglyoxylate	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995, Müller <i>et al.</i> 1999). . <i>A. evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995)				
Mandelate	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
2-Phthalate	. <i>A. evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995) . Nozawa et Maruyama 1988b			Kleerebezem <i>et al.</i> 1999	
3-Phthalate	Nozawa et Maruyama 1988 a			Kleerebezem <i>et al.</i> 1999	
4-Phthalate				Kleerebezem <i>et al.</i> 1999	
Tans-cinnamate		<i>Ferroglobus placidus</i> (Tor et Lovley 2001)			<i>Blastochoris sulfoviridis</i> ToP1 (Zengler <i>et al.</i> 1999) <i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
4-Coumarate					<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
Ferulate				<i>Sporobacterium olearium</i> (Mechichi <i>et al.</i> 1999)	<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
Vanillate				<i>Sporobacterium olearium</i> (Mechichi <i>et al.</i> 1999)	<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
Protocatechuate	<i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995)		Cat2 (Schnell <i>et al.</i> 1989)		
Syringate				<i>Parasporobacterium paucivorans</i> (Lomans <i>et al.</i> 2001)	
Gallate				<i>H. foetida</i> (Liesack <i>et al.</i> 1994) <i>Sporobacterium olearium</i> (Mechichi <i>et al.</i> 1999)	
3,4,5-triOCH ₃ -Benzoate					
2-naphtoate			NaphS2 (Galushko <i>et al.</i> 1999)		

Dérivés aminés	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
Aniline	Strain HY99 (Kahng <i>et al.</i> 2000)				
Phénylamine	. <i>T. aromatica</i> K172 (Anders <i>et al.</i> 1995, Schneider <i>et al.</i> 1997) . pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999) . EbN1 (Rabus et Widdel 1995) . <i>Azoarcus evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995)				
Tyrosine	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
Tryptophane	pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)				
Composés et métabolites relatifs	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	Fe(III), Mn(II)	SO ₄ ²⁻	Produits de fermentation, méthanogénèse	Phototrophes
Benzylsuccinate			oXyS1 (Harms <i>et al.</i> 1999)		<i>Blastochoris sulfoviridis</i> ToP1((Zengler <i>et al.</i> 1999)
Cyclohexane-carboxylate	. <i>Azoarcus evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995) . pCyN1 (Harms <i>et al.</i> 1999)			<i>S. aciditrophicus</i> (Elshahed <i>et al.</i> 2001)	<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
Cyclo-hex-1-ene-carboxylate				<i>S. aciditrophicus</i> (Elshahed <i>et al.</i> 2001)	<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
Pimelate	. <i>Azoarcus evansii</i> KB 740 (Anders <i>et al.</i> 1995) . <i>Pseudomonas</i> LP-1 (Gallus et Schink 1994)				<i>R. palustris</i> (Harwood et Gibson 1988)
2,4,6-Trinitrotoluène			. Boopathy <i>et al.</i> 1997 . Krumholz <i>et al.</i> 1997	Krumholz <i>et al.</i> 1997	
Acetophenone	EbN1, PbN1 (Rabus et Widdel 1995) EB1 (Ball <i>et al.</i> 1996)				
Propiophenone	PbN1 (Rabus et Widdel 1995)				

ANNEXE 2 : MILIEU SYNTHETIQUES OU SEMI-SYNTHETIQUES

I. MILIEU LACTATE B POUR *DESULFOVIBRIO* (WIDDEL ET BAK) : LB

■	Eau distillée	1l
---	---------------	----

Introduire ensuite les composés solides les uns après les autres afin d'éviter la formation de précipités.

■	Sodium lactate	7g (5,5ml)
■	CaSO ₄	1g
■	NH ₄ Cl	1g
■	KH ₂ PO ₄	0,5g
■	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2g
■	Extrait de levure	1g

Ajuster le pH à 7,2 et Autoclaver 20 min à 120°C.

Après autoclavage, ajouter en conditions stériles:

■	Solution de FeSO ₄	10ml
■	Solution de réducteurs	10ml

Répartir sous atmosphère CO₂ ou N₂ en tubes de Balch ou flacons antibiotiques.

Pour une incubation sous H₂, ajouter au milieu de l'acétate de sodium à raison de 0,2 ou 0,4g par litre.

Pour un milieu solide, ajouter à la préparation 15 g de bacto-agar par litre.

II. MILIEU LACTATE C POUR *DESULFOVIBRIO* (WIDDEL ET BAK) : LC

■	Eau distillée	1l
---	---------------	----

Introduire ensuite les composés solides les uns après les autres afin d'éviter la formation de précipités.

■	Sodium lactate	12g (9,5ml)
■	Na ₂ SO ₄	4,5g
■	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,06g
■	Citrate de sodium	0,3g
■	NH ₄ Cl	1g
■	KH ₂ PO ₄	0,5g
■	MgSO ₄ , 7H ₂ O	2g
■	Extrait de levure	1g

Ajuster le pH à 7,2 et Autoclaver 20 min à 120°C.

Après autoclavage, ajouter en conditions stériles:

■	Solution de FeSO ₄	10ml
■	Solution de réducteurs	10ml

Répartir sous atmosphère CO₂ ou N₂ en tubes de Balch ou flacons antibiotiques.

Pour une incubation sous H₂, ajouter au milieu de l'acétate de sodium à raison de 0,2 ou 0,4g par litre.

Pour un milieu solide, ajouter à la préparation 15 g de bacto-agar par litre.

III. "FRESHWATER DEFINED MULTIPURPOSE MEDIUM" (WIDDEL ET BAK): DMF

■	Eau distillée	1l
■	NaCl	1g
■	MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,4g
■	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1g
■	NH ₄ Cl	0,25g
■	KH ₂ PO ₄	0,2g
■	KCl	0,5g
■	Résazurine	1ml

Pour éviter la formation de précipité, ajouter les sels les uns après les autres. Autoclaver 20 min à 121°C
Après autoclavage, ajouter en conditions stériles :

■	Solution d'oligoéléments de Widdel	1ml
■	Solution de Sélénite-tungstate	1ml
■	Solution de NaHCO ₃	30ml
■	Solution de vitamines	1ml
■	Solution de Thiamine	1ml
■	Solution de Vitamines B12	1ml

Contrôler stérilement le pH en prélevant des aliquots, le pH doit être compris entre 7 et 7,3. Ajouter stérilement de l'H₂SO₄ (1M) ou du Na₂CO₃ (1M)

Ajouter :

■	Solution de Na ₂ S	7,5ml
---	-------------------------------	-------

Répartir en conditions stériles en tubes ou en flacons antibiotiques.

III. "LAKE SEDIMENT DEFINED MULTIPURPOSE MEDIUM" (WIDDEL ET BAK): DMS

■	Eau distillée	1l
■	NaCl	0.25 g
■	MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,2 g
■	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1g
■	NH ₄ Cl	0,1 g
■	KH ₂ PO ₄	0,1g
■	KCl	0,1 g
■	Résazurine	1ml

Pour éviter la formation de précipité, ajouter les sels les uns après les autres. Autoclaver 20 min à 121°C.
Après autoclavage, ajouter en conditions stériles :

■	Solution d'oligoéléments de Widdel	1ml
■	Solution de Sélénite-tungstate	1ml
■	Solution de NaHCO ₃	30ml
■	Solution de vitamines	1ml
■	Solution de Thiamine	1ml
■	Solution de Vitamines B12	1ml

Contrôler stérilement le pH en prélevant des aliquots, le pH doit être compris entre 7 et 7,3. Ajouter stérilement de l'H₂SO₄ (1M) ou du Na₂CO₃ (1M)

Ajouter :

■	Solution de Na ₂ S	7,5ml
---	-------------------------------	-------

Répartir en conditions stériles en tubes ou en flacons antibiotiques.

ANNEXE 3 : MILIEU SYNTHETIQUES OU SEMI-SYNTHETIQUES "POUR METHANOGENES"

MILIEU MINIMUM METHANOGENES ACETOTROPHES (MAM) ET HYDROGENOTROPHES (MHM)

■	Solution minérale I	25ml
■	Solution minérale II	25ml
■	Résazurine	0,5ml
■	NH ₄ Cl	0,25g
■	Jus de sédiment	100ml
■	Eau distillée	Qsp 500ml

Porter à ébullition, refroidir à 60°C sous CO₂

Ajouter :

■	NaHCO ₃	2,5g
■	Cystéine-HCl	0,25g

Autoclaver 20 min à 121°C. Répartir en tubes ou flacons antibiotiques.

Ajouter (en conditions stériles : filtration des solutions sur unité de filtration 0,2 µm) :

■	Solution d'oligoéléments de Balch	5ml
■	Solution de vitamines de Balch	5ml

Remarque : 5g.l⁻¹ d'acétate pour les méthanogènes acétotrophes

ANNEXE 4 : MILIEU "SIMULANT L'HABITAT NATUREL"

I. MILIEU MINIMUM NATUREL EAU : MNE

La solution minimum de ce milieu est uniquement constitué de vitamines, d'oligoéléments et d'une solution tampon. L'eau du site jouera à la fois le rôle d'inoculum et de milieu de culture:

■	Vitamines de Balch	10 ml
■	Oligoéléments de Balch	10 ml
■	NaHCO ₃	5g
■	Eau distillée	Qsp 1l

I. MILIEU MINIMUM NATUREL SEDIMENT: MNS (Protocole de Vester *et al.* 1998 modifié)

Préparation du sédiment :

- Dilution du sédiment avec de l'eau du site (1 :1, vol/vol)
- Homogénéisation (si nécessaire dans un mixeur)
- Si nécessaire, filtration successives (1 ; 0,5 ; 0,25 mm)
- Autoclaver 20 min à 121°C
- Refroidir sous agitation magnétique et sous N₂
- Dispenser des aliquots de 8 ml de la suspension de sédiment en conditions anaérobies en tubes de Balch
- Incubation 24 h à température ambiante
- Autoclaver une seconde fois 20 min à 121°C
- Conserver à 5°C

Ajouter dans chaque tube, 3 ml d'une solution mère contenant:

■	Vitamines de Balch	10 ml
■	Oligoéléments de Balch	10 ml
■	NaHCO ₃	5g
■	Eau distillée	Qsp 1l

ANNEXE 5 : MILIEU DE TRANSFERT DES COLONIES ISOLEES : MILIEU LM

Les temps de croissance sur les milieux préalablement définis (Annexe 2-4) peuvent être extrêmement longs (de plusieurs semaines à plusieurs mois), de même que la formation des colonies sur gélose. Après s'être assuré de la purification de la colonie, ces dernières sont transférées dans un milieu minimum plus nutritif que les précédents. A ce milieu sont ajoutés les donneurs et accepteurs d'électrons qui avaient préalablement été supplémentés dans les milieux d'isolement.

■ Composition du milieu LM :

KCl	0.6 g
NaCl	0.6 g
MgSO ₄	0.5 g
CaCl ₂	0.1 g
NH ₄ Cl	0.54 g
PIPES	1.5 g
Solution d'oligoéléments de Balch	10 ml
Solution de vitamines de Balch	10 ml
Résazurine 0.1 %	1 ml
Hémine 0.1 %	1 ml
Tryptone	1 g
Extrait de levure	1 g
Eau distillée	968 ml

Ajuster le pH à 6.8 avec du KOH
Porter à ébullition. Refroidir à 60°C et ajouter :

NaHCO ₃	5 g
Cystéine-Sulfure-HCl	1 g

Répartir sous CO₂ et autoclaver 20 minutes à 121°C.

ANNEXE 6 : MILIEU DE DILUTION DE BRYANT ET BURKEY

■ Solution minérale I	75 ml
■ Solution minérale II	75 ml
■ Résazurine (0.1%)	1 ml
■ H ₂ O distillée	850 ml

Porter à ébullition 10 min et laisser refroidir jusqu'à 60°C sous atmosphère CO₂ avant d'ajouter :

■ NaHCO ₃	4 g
■ Cystéine-HCl	0.5 g

Après décoloration de la résazurine, répartir le milieu sous atmosphère CO₂, à raison de 9 ml par tube.

Composition des solutions minérales

Solution minérale I :

■ K ₂ HPO ₄	600 mg
■ H ₂ O	100 ml

Solution minérale II :

■ KH ₂ PO ₄	600 mg
■ (NH ₄) ₂ SO ₄	1.2 g
■ NaCl	1.2 g
■ MgSO ₄ , 7H ₂ O	120 mg
■ CaCl ₂ , 2 H ₂ O	120 mg
■ H ₂ O	100 ml

ANNEXE 7 : PREPARATION DES "SOLUTIONS STOCKS"

Toutes les solutions stocks sont conservées dans des tubes ou flacons munis de septum butyle en conditions anaérobies.

■ Solution de FeSO₄

FeSO₄, 7H₂O.....2,1 g
Eau distillée.....10 ml

Pressuriser sous N₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C.

■ Solution de réducteurs pour milieux LB et LC

Eau distillée..... 10 ml
Thioglycollate de sodium0.1 g
Acide ascorbique0.1 g

Pressuriser sous N₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C.

■ Solution de sélénite tungstate :

Eau distillée.....1 l
NaOH.....0.4 g
Na₂SeO₃, 5H₂O.....6 mg
Na₂WO₄, 2H₂O.....8 mg

Pressuriser sous N₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C.

■ Solution de bicarbonate (1M):

Eau distillée.....1 l
NaHCO₃.....0.4 g

Pressuriser sous CO₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C.

■ Solution de Vitamine B12:

Eau distillée.....100 ml
Cyanocobalamine.....5 mg

Stériliser par filtration et pressuriser sous CO₂ pour éviter l'oxydation.

■ Solution sulfide (0.2M):

Eau distillée.....100 ml
Cristaux de Na₂S, 9 H₂O.....4.8g

Pressuriser sous N₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C. (La formation de précipité n'affecte pas l'utilisation)

■ Solution de vitamines de Widdel

Tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7.1).....	1 l
Acide 4-Aminobenzoic	4 mg
D(+)-Biotine.....	1 mg
Acide nicotinique.....	10 mg
Calcium D(+)-pantothénate.....	5 mg
Pyridoxine dihydrochloride.....	15 mg

La solution est stérilisée par filtration, pressuriser sous N₂, et conservée à 4°C à l'obscurité.

■ Solution de Thiamine

Tampon phosphate de sodium (25 mM, pH 3.4).....	1 l
Thiamine chloride dihydrochloride.....	10 mg

La solution est stérilisée par filtration, pressuriser sous N₂, et conservée à 4°C à l'obscurité.

■ Solution d'Oligoéléments de Widdel

Eau distillée.....	987 ml
HCl (25%=7.7M)	12,5 ml (100mM)
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	2100 mg (7.5mM)
H ₃ BO ₃	30 mg (0.5 mM)
MnCl ₂ , 4H ₂ O.....	100 mg (0.5 mM)
CoCl ₂ , 6H ₂ O.....	190 mg (0.8 mM)
NiCl ₂ , 6H ₂ O.....	24 mg (0.1mM)
CuCl ₂ , 2H ₂ O.....	2 mg (0.01 mM)
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	144 mg (0.5 mM)
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O.....	36 mg (0.15 mM)

Pressuriser sous N₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C.

■ Solution de Vitamines de Balch (Balch *et al.* 1979)

Eau distillée.....	1000 ml
Biotine.....	2 mg
Acide p-aminobenzoïque.....	5 mg
Ascorbate de Na.....	5 mg
Acide folique.....	2 mg
Pyridoxine hypochloride.....	10 mg
Thiamine hydrochloride.....	5 mg
Riboflavine.....	5 mg
Acide nicotinique.....	5 mg
Panthothénate de Ca.....	5 mg
Vitamine B12 (solution à 0.01%).....	1 ml
Acide lipoïque.....	5 mg
Choline chloride.....	5 mg
Myo-inositol.....	5 mg
Niacinamide.....	5 mg
Pyridoxal hypochloride.....	5 mg

La solution est stérilisée par filtration, pressuriser sous N₂, et conservée à 4°C à l'obscurité.

■ Solution d'Oligoéléments de Balch (Balch *et al.* 1979)

Eau distillée.....	1000 ml
Acide nitrilotriacétique.....	1.5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	3 g
MnSO ₄ , 2H ₂ O.....	0.5 g
NaCl.....	1 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.1 g
CoSO ₄	0.1 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O.....	0.1 g
ZnSO ₄ , 2H ₂ O.....	0.1 g
NiCl ₂ , 6H ₂ O.....	0.1 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0.01 g
AlK(SO ₄) ₂	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O.....	0.01 g
Na ₂ SeO ₃	0.01 g

Remarque: l'acide nitrilotriacétique est dissous dans 500 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 6.5 avec KOH 1M. Compléter le volume à 1000 ml.

Pressuriser sous N₂ pour éviter l'oxydation et autoclaver 20 min à 121°C.

■ Solution de Résazurine à 0.1 %

Dissoudre 0.1 g de résazurine dans 100 ml d'eau distillée.

■ Solution d'Hémine à 0.1 %

Dissoudre 0.1 g d'hémine dans 10 ml d'éthanol. Ajuster à 100 ml avec NaOH 0.05 M.

■ Jus de sédiment

Le sédiment, prélevé avec une "benne Heckmann", est filtré à travers deux couches de gazes. Le filtrat est centrifugé (3000 rpm, 15 min), et le surnageant est centrifugé (3000 rpm, 15 min) une seconde fois. Le jus de sédiment est stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

ANNEXE 8 : CONDITIONS DE CULTURE

Toutes les conditions de culture ont été réalisées à partir d'inocula prélevés à 60-m, 70-m, 90-m, Interface eau-sédiment, et sédiment (0-3 cm).

I- MILIEU DESULFOVIBRIO B ET C

Code	Desulfovibrio B	Desulfovibrio C	Dilution				Phase gazeuse		
			0	-1	-2	-3	N ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂	acétate
D1	+	-	+	-	-	-	+	-	-
D2	+	-	-	+	-	-	+	-	-
D3	+	-	-	-	+	-	+	-	-
D4	+	-	-	-	-	+	+	-	-
D5	+	-	+	-	-	-	-	+	+
D6	+	-	-	+	-	-	-	+	+
D7	+	-	-	-	+	-	-	+	+
D8	+	-	-	-	-	+	-	+	+
D9	-	+	+	-	-	-	+	-	-
D10	-	+	-	+	-	-	+	-	-
D11	-	+	-	-	+	-	+	-	-
D12	-	+	-	-	-	+	+	-	-
D13	-	+	+	-	-	-	-	+	+
D14	-	+	-	+	-	-	-	+	+
D15	-	+	-	-	+	-	-	+	+
D16	-	+	-	-	-	+	-	+	+

II- MILIEU DMF

	Donneur d'e-					accepteur d'e-				Phase gazeuse	
	acétate	lactate	formiate	fumarate	SO ₄ ²⁻	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	Mn ³⁺	Fe ³⁺ /NO ₃ ⁻	H ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂
DMF 1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DMF 2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
DMF 3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
DMF 4	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
DMF 5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
DMF 6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
DMF 7	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
DMF 8	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
DMF 9	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
DMF 10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
DMF 11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DMF 12	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
DMF 13	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
DMF 14	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
DMF 15	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
DMF 16	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
DMF 17	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
DMF 18	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
DMF 19	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
DMF 20	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
DMF 21	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
DMF 22	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
DMF 23	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
DMF 24	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
DMF 25	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
DMF 26	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
DMF 27	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
DMF 28	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
DMF 29	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
DMF 30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
DMF 31	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
DMF 32	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
DMF 33	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
DMF 34	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
DMF 35	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
DMF 36	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DMF 37	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
DMF 38	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
DMF 39	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
DMF 40	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+

III- MILIEU DMS (uniquement pour les échantillons de sédiment)

	Donneur d'e-				accepteur d'e-				Phase gazeuse		
	acétate	lactate	formiate	fumarate	SO ₄ ²⁻	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	Mn ³⁺	Fe/NO ₃	H ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂
DMS 1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DMS 2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
DMS 3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
DMS 4	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
DMS 5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
DMS 6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
DMS 7	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
DMS 8	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
DMS 9	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
DMS 10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
DMS 11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DMS 12	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
DMS 13	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
DMS 14	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
DMS 15	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
DMS 16	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
DMS 17	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
DMS 18	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
DMS 19	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
DMS 20	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
DMS 21	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
DMS 22	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
DMS 23	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
DMS 24	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
DMS 25	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
DMS 26	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
DMS 27	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
DMS 28	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
DMS 29	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
DMS 30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
DMS 31	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
DMS 32	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
DMS 33	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
DMS 34	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
DMS 35	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
DMS 36	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
DMS 37	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
DMS 38	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
DMS 39	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
DMS 40	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+

IV- MILIEU MAM

Phase gazeuse						
Code	N ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂	EL*	Trypticase	Formiate	Acétate
MAM 1	+	-	+	+	+	+
MAM 2	+	-	+	+	+	-
MAM 3	+	-	+	+	-	+
MAM 4	+	-	+	-	+	+
MAM 5	+	-	+	-	+	-
MAM 6	+	-	+	-	-	+
MAM 7	+	-	-	+	+	+
MAM 8	+	-	-	+	+	-
MAM 9	+	-	-	+	-	+
MAM 10	+	-	-	-	+	+
MAM 11	+	-	-	-	+	-
MAM 12	+	-	-	-	-	+

V- MILIEU MHM

Phase gazeuse						
Code	N ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂	EL	Trypticase	Formiate	Acétate
MHM 1	-	+	+	+	+	+
MHM 2	-	+	+	+	+	-
MHM 3	-	+	+	+	-	+
MHM 4	-	+	+	-	+	+
MHM 5	-	+	+	-	+	-
MHM 6	-	+	+	-	-	+
MHM 7	-	+	-	+	+	+
MHM 8	-	+	-	+	+	-
MHM 9	-	+	-	+	-	+
MHM 10	-	+	-	-	+	+
MHM 11	-	+	-	-	+	-
MHM 12	-	+	-	-	-	+

* EL : Extrait de levure

VI- MILIEU MNE

	Donneur d'e- potentiel				Accepteur potentiel					Vit+oligo [†]	H ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂
	Acétate	lactate	formiate	fumarate	SO ₄ ²⁻	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	Mn ³⁺	Fe/NO ₃ ⁻			
E1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
E2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
E3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
E4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
E5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
E6	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
E7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
E8	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
E9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
E10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
E11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
E12	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
E13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
E14	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
E15	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
E16	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
E17	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
E18	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
E19	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
E20	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
E21	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
E22	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
E23	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
E24	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
E25	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
E26	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
E27	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
E28	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
E29	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
E30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
E31	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
E32	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
E33	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
E34	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
E35	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
E36	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
E37	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
E38	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
E39	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
E40	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
E41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
E44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
E45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
E48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

[†] Vit et oligo : vitamines et oligoéléments de Balch,

VII- MILIEU MNS (uniquement pour les échantillons de sédiment)

	Donneur d'e- potentiels				Accepteurs potentiels					Vit+oligo	H ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂
	Acétate	lactate	formiate	fumarate	SO ₄ ²⁻	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	Mn ³⁺	Fe/NO ₃ ⁻			
S1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
S4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
S6	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
S8	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
S9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
S10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
S11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S12	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
S14	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S15	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
S16	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S17	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
S18	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
S19	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
S20	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
S21	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S22	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
S23	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
S24	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S25	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
S26	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S27	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
S28	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
S29	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
S30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
S31	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S32	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S33	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
S34	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
S35	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
S36	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
S37	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
S38	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
S39	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
S40	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
S41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
S44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

ANNEXE 9 : METHODES DE PRELEVEMENTS



BOUTEILLE VAN DORN



Prélèvement à travers le septum
butyle central

Conditionnement des échantillons
dans des tubes ou flacons stériles
préalablement "flushés" sous CO₂.



CAROTTIER MULTIPLE JENKIN-MORTIMER